

SÉRIE A, N° 93

N° D'ORDRE :

113

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

Jean BLANC

DOCTEUR EN MÉDECINE

1^{re} THÈSE. — SUR LES FERMENTS PROTÉOLYTIQUES DES ANAÉROBES
PATHOGÈNES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 9 Juin 1921 devant la Commission d'examen

Président : MM. MOLLIARD.
Examineurs { PORTIER.
FERNBACH.

LAVAL

L. BARNÉOUD ET C^{ie}, IMPRIMEURS

1921

24

SÉRIE A, N° 93

N° D'ORDRE :

113

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

Jean BLANC

DOCTEUR EN MÉDECINE

1^{re} THÈSE. — SUR LES FERMENTS PROTÉOLYTIQUES DES ANAÉROBES
PATHOGÈNES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 9^{juin} 1921 devant la Commission d'examen



Président : MM. MOLLIARD.

Examineurs { PORTIER.
FERNBACH.

LAVAL

L. BARNÉOUD ET C^{ie}, IMPRIMEURS

1921

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen..... MOLLIARD, *Prof*... Physiologie végétale.
Doyen honoraire.... P. APPELL.....

Profess. honoraires.. { P. PUISEUX.
 VÉLAIN.
 BOUSSINESQ
 BOUTY.....

LIPPMANN Physique.
 E. PICARD Analyse supér. et algèbre supérieure.
 G. BONNIER Botanique.
 KOENIGS Mécanique physique et expérimentale.
 GOURSAT Calcul différentiel et calcul intégral.
 HALLER Chimie organique.
 JOANNIS Chimie (Enseignement P. C. N.).
 JANET Electrotechnique générale.
 WALLERANT Minéralogie.
 ANDOYER Astronomie.
 PAINLEVÉ Mécanique anal. et mécan. céleste.
 HAUG Géologie.
 H. LE CHATELIER. Chimie générale.
 G. BERTRAND..... Chimie biologique.
 M^{me} P. CURIE..... Physique générale.
 CAULLERY Zoologie (Évolution des êtres organisés)
 C. CHABRIÉ..... Chimie appliquée.
 G. URBAIN..... Chimie minérale
 EMILE BOREL Calcul des probabilités et phys. mathém.
 MARCHIS Aviation.
 JEAN PERRIN..... Chimie physique.
Professeurs.... { G. PRUVOT..... Zoologie, anatomie, physiologie compar.
 MATRUCHOT..... Botanique.
 ABRAHAM Physique.
 CARTAN Mécanique rationnelle.
 CL. GUICHARD.... Géométrie supérieure.
 LEBESGUE..... Application de l'analyse à la géométrie.
 LAPICQUE..... Physiologie.
 GENTIL Géographie physique.
 VESSIOT Calcul différentiel et calcul intégral.
 COTTON Physique théorique et physique céleste.
 DRACH Mathématiques générales.
 C. FABRY Physique. —
 CHARLES PÉREZ... Zoologie, anatomie, physiol. comparée
 N..... Histologie.

 LEDUC..... Physique.
 HEROUARD..... Zoologie.
 LÉON BERTRAND... Géologie.
 RÉMY PERRIER.... Zoologie (Enseignement P. C. N.).
 LESPIEAU Chimie.
 SAGNAC..... Physique (Enseignement P. C. N.).
 RABAUD Biologie générale.
 PORTIER Physiologie.
 BLAISE..... Chimie organique.
 PÉCHARD Chimie (Enseignement P. C. N.).

Secrétaire..... D. TOMBECK.

PREMIÈRE THÈSE

SUR LES FERMENTS PROTÉOLYTIQUES
DES ANAÉROBIES PATHOGÈNES

1. *Etude du B. sporogenes* (METCHNIKOFF).
2. *Etude du B. histolyticus* (WEINBERG et SÉGUIN).

*Travail des Laboratoires de Microbie technique
et de Physiologie de l'Institut Pasteur.*

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	3
I. — EXPOSITION DU SUJET	4
II. — ETUDE DES MICROBES	7
III. — MÉTHODES GÉNÉRALES.	9
A. — Mesure de la protéolyse.	9
B. — Cultures anaérobies.	12
C. — Isolement des enzymes.	15
D. — La question des ions H.	22
IV. — DIGESTION <i>in vivo</i>	32
A. — Injection dans les muscles	32
B. — Pouvoir hémotoxique	38
V. — DIGESTION DU MUSCLE <i>in vitro</i>	40
VI. — DIGESTION DE L'ALBUMINE <i>in vitro</i>	49
1° Albumine du sérum.	49
2° Albumine d'œuf.	54
3° Albumine du lait.	59
VII. — INFLUENCE DE LA COAGULATION SUR LA DIGESTION DES ALBUMINES.	64
VIII. — SITUATION DES FERMENTS DU SPOROGÈNE ET DE L'HISTOLYTIQUE DANS L'ÉCHELLE DES FERMENTS SOLUBLES.	67
IX. — LOI D'ACTION DES FERMENTS.	80
X. — POUVOIR EMPÊCHANT DU SÉRUM NORMAL ET DES SÉRUMS SPÉCIFI- QUES.	83
XI. — CONCLUSIONS	89
XII. — BIBLIOGRAPHIE	91



Digitized by the Internet Archive
in 2026

PREMIÈRE THÈSE

SUR LES FERMENTS PROTÉOLYTIQUES DES ANAÉROBIES PATHOGÈNES

INTRODUCTION

Au seuil de cet exposé, nous sommes heureux de témoigner notre respectueuse reconnaissance à M. le Docteur Roux qui a bien voulu nous accueillir à l'Institut Pasteur.

Notre travail appartient également à la Microbiologie technique et à la Chimie physiologique. Il nous a été grandement facilité par l'amabilité de notre maître R. LEGROUX, qui nous a reçu dans son laboratoire et qui nous a prodigué son précieux enseignement, et par E. POZERSKI, à qui revient l'idée de cette étude et qui nous a ouvert les portes du laboratoire de physiologie de l'Institut Pasteur. Nous leur exprimons notre bien vive gratitude.

Nous tenons aussi à remercier M. le Professeur M. NICOLLE, à qui nous avons emprunté souvent des idées théoriques, M. WEINBERG qui nous a fait profiter de sa science des anaérobies, M. le Docteur K. G. DERNBY qui a bien voulu s'intéresser à notre travail.

Notre reconnaissance va également à M. le Professeur MOLLARD, Doyen de la Faculté des Sciences, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de thèse.

I

EXPOSITION DU SUJET

L'infection des plaies de guerre par les microbes anaérobies a donné lieu à une série d'hypothèses relatives à la pathogénie de la gangrène gazeuse et du choc.

En particulier, de nombreux auteurs ont rattaché ces phénomènes à des digestions musculaires dont les produits de désintégration iraient par la voie sanguine intoxiquer l'organisme.

Dans la gangrène gazeuse, en effet, la fonte des masses musculaires s'accompagne d'une altération rapide de l'état général qui rappelle les symptômes du choc causé par les injections intra-veineuses de peptones.

Ces phénomènes ont été reproduits expérimentalement par P. DELBET en injectant à l'animal les produits d'autolyse musculaire.

D'autres auteurs, dosant l'azote dans le sang d'animaux traumatisés et de blessés en état de choc, ont constaté une augmentation de l'azote non protéique, produit ordinaire de la digestion des albumines.

La protéolyse dans les lésions de la gangrène gazeuse, et le passage des produits de digestion dans le sang sont donc indiscutables. Mais jusqu'à présent on ignorait à quel stade, peptones, acides aminés, ammoniacque, cette désintégration aboutissait, et quelle était la nature endogène ou exogène des ferments en cause. A-t-on affaire à des ferments d'origine musculaire ou bien à des ferments microbiens ?

A l'origine de notre travail, nous nous étions seulement

proposés de rechercher si les anaérobies digéraient le tissu musculaire dans les gangrènes gazeuses. Dans la négative nous devons nous demander quel était l'agent inconnu de la digestion.

Nous avons d'abord étudié les meilleures conditions de culture des microbes que nous avons pris pour types d'étude. Nous avons fait varier la composition du milieu de culture et recherché dans quel cas la protéolyse des microbes sur le milieu était la plus grande.

Les microbes agissant par leurs ferments, nous avons ensuite essayé d'isoler les diastases contenues dans les cultures. En prenant pour tests de digestion la gélatine et les cubes de blanc d'œuf coagulé, nous avons mesuré grossièrement la protéolyse de ces ferments solubles, et déterminé ainsi la manière d'obtenir le ferment le plus actif.

Ces conditions optima déterminées, nous avons essayé le pouvoir protéolytique de nos microbes et de leurs enzymes d'abord sur le muscle vivant, en injectant l'animal, puis sur le muscle séparé de l'organisme, *in vitro*.

Nous avons eu parfois des résultats négatifs, mais finalement, nous avons pu en regard des faits positifs placer l'explication des insuccès.

Nous aurions pu nous arrêter là. Mais la digestion du muscle cru sans le secours d'une dénaturation quelconque n'est pas un phénomène banal. Seuls les ferments végétaux du type papaine agissent de la sorte. Les ferments des microbes anaérobies étaient-ils analogues ? Il était donc nécessaire de les définir plus complètement. Aussi avons-nous élargi notre étude.

Nous avons essayé de préciser quelles albumines attaquaient les ferments de l'Histolytique et du Sporogène, microbes choisis pour notre étude, sous quelle forme ils digéraient ces albumines, et quels étaient les produits de dégradation.

L'étude de la digestion des albumines du sérum, de l'œuf, et du lait, nous a permis ainsi de situer les ferments de ces deux microbes dans l'échelle des ferments protéolytiques classiques.

Enfin, nous avons terminé notre travail par la recherche du degré de parenté des deux microbes. Nous avons pu démontrer que ces derniers, tout en sécrétant des enzymes très voisins, appartenaient cependant à deux familles microbiennes étrangères, du fait que leurs sérums antiprotéasiques étaient étroitement spécifiques.

II

ÉTUDE DES MICROBES

Parmi les agents anaérobies de la gangrène gazeuse, nous avons choisi deux des microbes le plus fréquemment rencontrés.

Le premier est du type *Sporogenes*, dont KLEIN, METCHNIKOFF, enfin A. BERTHELOT ont fixé les caractères. Il est considéré comme l'un des plus puissants microbes protéolytiques.

TISSIER lui donne la première place pour la solubilisation des albumines de la fibrine, de la viande, de l'œuf, du lait, devant les *B. putrificus*, *B. colicogenes*, *B. perfringens*, et le *B. proteus*.

EFFRONT, dosant après trente jours de fermentation l'azote ammoniacal libéré dans un même milieu ensemencé avec : *B. proteus*, *B. sporogenes*, *B. putrificus*, *B. mesentericus*, *B. butyricus*, *B. pseudo-lacticus*, montre également que le Sporogène donne un des taux les plus élevés.

Enfin, la plupart des travaux récents de protéolyse bactérienne (H. TISSIER, 1912, WOLF et HARRIS, 1917, WOLF et VEITCH-TELFER, 1917, VAUCHER et GUÉRIN, 1918), ont pris pour type d'étude le Sporogène.

Dans la gangrène gazeuse, ce bacille est rarement seul en cause. Associé au *B. perfringens*, il constitue une forme d'œdème malin. Avec d'autres microbes, au contraire, il se caractérise par une intense myolyse locale.

Il nous a paru intéressant de comparer ce microbe anciennement connu à une nouvelle espèce récemment isolée et décrite

par WEINBERG et SÉGUIN : le *B. histolyticus*. Ce bacille, très pathogène, est considéré comme moins protéolytique que le *B. sporogenes* ou que le *B. putrificus*, Mais *in vivo*, il possède une activité digestive qui le place bien au-dessus des autres espèces. Dans l'ouvrage de WEINBERG et SÉGUIN, quelques planches sont consacrées aux lésions provoquées chez le cobaye par l'injection dans les muscles d'une culture d'*Histolytique*. Après vingt heures, la lésion s'est spontanément ouverte et montre la fonte intense de tous les tissus : débris musculaires sanguinolents, tendons effilochés, sérosité rougeâtre où pullulent les bacilles. Dans la profondeur s'aperçoit le fémur dénudé. Cette mortification si rapide, si puissante est vraiment remarquable.

L'étude comparée de l'*Histolytique* et du *Sporogène*, tous deux protéolytiques, mais l'un digérant mieux l'albumine *in vivo*, l'autre plus actif *in vitro*, promettait d'être très instructive.

Les souches étudiées proviennent des collections de l'Institut Pasteur. Des cinq types de *Sporogène* que nous avons cultivés, nous avons retenu la race O comme la plus protéolytique. Par contre, nous n'avons eu entre les mains qu'un seul type d'*Histolytique*, fourni d'ailleurs par la même collection.

III

MÉTHODES GÉNÉRALES

A. — MESURE DE LA PROTEOLYSE

Nous avons étudié les variations de l'activité des ferments de l'Histolytique et du Sporogène, variations avec les conditions de culture, avec l'âge des cultures, enfin avec le mode d'obtention des ferments.

Pour mesurer d'une façon rapide et commode cette activité diastasique, nous avons adopté l'épreuve de la *digestion de la gélatine*.

Nous avons pris de la gélatine extra-fine, fondue au bain-marie à 50 degrés dans dix fois son poids d'eau distillée. Nous avons alcalinisé cette gélatine au tournesol (environ 1 cc. de soude décinormale pour 10 cc. de liquide), puis nous l'avons chauffée à 110 degrés pendant 10 minutes pour précipiter les phosphates. Nous avons ensuite filtré la solution, réparti en tubes par 2 cc., enfin nous avons stérilisé ces tubes 10 minutes à 105 degrés.

Nous avons ajouté à cette gélatine liquéfiée à 37 degrés, des quantités de ferment variables que nous avons laissées agir à 38-40 degrés. Toutes les dix minutes, nous retirions les tubes pour les mettre dans un bain à 12 degrés. Les tubes témoins se resolidifiaient en 2 minutes 30 sec. ; les tubes contenant le ferment restaient au contraire liquides plus ou moins longtemps. Nous considérions la digestion comme totale lorsque la gélatine était encore liquide après 20 minutes de séjour à 12 degrés.

Cette méthode nous a ainsi permis de choisir les ferments les plus actifs. Avec les ferments obtenus dans les meilleures conditions, nous avons ensuite recherché les modalités de la digestion des deux microbes sur les diverses albumines. Comme la digestion de la gélatine ne nous donnait que des indications grossières sur les actions digestives, nous avons utilisé deux autres méthodes pour mesurer la protéolyse d'une façon plus détaillée et plus exacte :

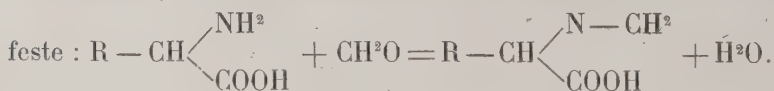
(1) *Titration de l'azote au formol.*

(2) *Précipitation par l'acide trichloracétique bouillant.*

(1) TITRAGE AU FORMOL. — Cette méthode due à SOERENSEN mesure quantitativement les protéines désagrégées au stade *acides aminés*. SOERENSEN a appliqué les observations de SCHIFF, que les solutions neutres d'acides aminés prennent une réaction acide par addition de formaldéhyde.

Les matières protéiques ont habituellement une réaction amphotère. Les chaînes peptides $\text{CH} \begin{matrix} \nearrow \text{NH}^2 \\ \searrow \text{COOH} \end{matrix}$ sont neutres.

Mais si l'on ajoute du formol, la fonction basique NH^2 entre en combinaison, la fonction acide COOH devient libre et se manifeste :



Le produit de la réaction se comporte comme un acide monoatomique. On titre ainsi les fonctions acides et indirectement les noyaux aminés apparus.

Technique de la méthode. — Nous avons mesuré dans un ballon 5 à 10 cc. du liquide contenant les produits de digestion à titrer. Nous avons neutralisé ce liquide en présence de phtaléine, avec une solution décimale de soude jusqu'à l'obtention d'une teinte légèrement rose. Nous avons ajouté ensuite 5 à 10 cc. de formol du commerce neutre à la phtaléine et filtré. Si le liquide titré contenait des acides aminés, il se décolorait. Nous versions alors en agitant, la solution décimale de soude jusqu'à la réapparition de la teinte rose primitive. Pour nous assurer que la réaction était complète, nous ajoutions au liquide 1 à

2 cc. de formol. Cette addition supplémentaire ne devait pas modifier la coloration obtenue. Le volume de soude employé indiquait la quantité de chaînes peptides libérées.

Cette méthode, d'après SØRENSEN, dose 90 0/0 de l'azote aminé. Elle donne de bons résultats quand le titrage se pratique sur une quantité de liquide suffisamment grande, de 4 à 10 cc., et si l'on emploie pour la réaction un minimum de 3 à 4 cc. de soude décimale. Nous avons tâché de rester dans ces limites, aussi n'avons-nous pas jugé nécessaire de recourir à la méthode de VAN SLIKE, plus récente, qui permet des mesures précises sur des quantités très réduites.

(2) LA PRÉCIPITATION PAR L'ACIDE TRICHLORACÉTIQUE À CHAUD, nous a permis de mesurer les digestions à un demi-milligr. près, et de reconnaître les produits de digestion moins avancés que les acides aminés :

Albumine vraie, est précipitée ;

Albumose, filtre à chaud, est précipitée à froid ;

Peptone, acide aminé, restent en solution

Nous avons ajouté aux liquides de digestion un égal volume d'une solution d'acide trichloracétique à 10 0/0. Nous avons porté les mélanges à l'ébullition, puis jeté les liquides sur un double filtre taré. Nous avons lavé les filtres rapidement à l'eau bouillante pour éviter leur corrosion par l'acide. Les filtres étaient ensuite desséchés à 37 degrés, puis à 105 degrés, jusqu'à poids constant, enfin pesés. Nous avons examiné chaque fois les liquides qui avaient filtré pour y rechercher les albumoses (précipité par refroidissement).

Le plus souvent, nous avons complété ces recherches par le dosage de l'ammoniaque (distillation en présence de magnésie légère), la caractérisation dans les produits de digestion : des peptones (réaction du biuret), de l'ammoniaque (réactif de NESSLER), des phénols (chlorure ferrique), de l'indol (réaction indol-nitreuse).

B. — CULTURES ANAÉROBIES

Les bacilles Sporogène et Histolytique sont des anaérobies stricts. Une première difficulté consistait à trouver un *mode de culture* pratique pour les expériences que nous nous proposons d'exécuter.

Nous avons commencé par faire des cultures dans le vide. Nos ballons de bouillon étaient stérilisés à l'autoclave à 105 degrés, ensemencés à 40 degrés, puis fermés au moyen d'un bouchon de caoutchouc vaseliné, traversé par un tube de verre. Le tube était adapté à une pompe, le vide effectué à une pression négative de 74 centimètres de mercure, puis le tube de verre étiré et scellé avec un fin chalumeau.

Ce procédé est parfait (on peut le compléter par un lavage avec un gaz inerte). Mais il est long et coûteux. Les ballons sont fragiles à cause du vide. Si pour une raison quelconque la culture se fait mal, on hésite à recommencer toutes ces manipulations.

Pour réaliser une anaérobiose facile et rapide des milieux de culture nous avons recouru au *sulfure de calcium*, qui produit une atmosphère de gaz sulfhydrique pratiquement dépourvue d'oxygène. Nous privions tout d'abord le bouillon de culture de la plus grande partie de l'air qu'il renfermait par une stérilisation à l'autoclave à 105 degrés, ou pour les petites quantités de milieu par une ébullition rapide au bain-marie à 100 degrés. Nous ajoutions ensuite une pincée de sulfure de calcium stérilisé au four à flamber (environ une anse de platine pour 10 centimètres cubes de bouillon). Nous ensemencions ensuite.

Nous nous sommes assuré que ce mode de culture conservait au bacille et à ses extraits tous les caractères des cultures dans le vide. CÉSARI et ALLEAUX ont fait la même constatation pour l'activité des toxines du B. de SCHMORL et du *B. tetani* cultivés dans les milieux au sulfure de calcium). Dans nos

mesures de protéolyse, nous n'avons jamais trouvé d'inconvénient à la présence de légères quantités de gaz sulfhydrique dans les liquides de digestion.

En recherchant le meilleur milieu de culture, nous avons constaté que le *bouillon de viande putréfiée* permettait, toutes choses égales d'ailleurs, une culture plus facile que le bouillon peptone ordinaire, soit qu'il contint des hormones favorisant le développement microbien, soit que sa teneur plus forte en acides aminés activât la protéolyse et la croissance.

PRÉPARATION DU BOUILLON DE VIANDE PUTRÉFIÉE. — Faire macérer un kilo de viande de bœuf hachée finement dans deux litres d'eau de fontaine, pendant 24 heures à 37 degrés. Faire bouillir à feu doux pendant 20 minutes. Filtrer, ajouter la quantité de soude décimorale nécessaire pour une réaction neutre à la phtaléine. Précipiter par un chauffage à 80 degrés, puis à l'autoclave à 115 degrés. Filtrer sur papier CHARDIN. Ajouter deux litres d'une solution de peptone à 40/0, neutre au tournesol. A ce moment le milieu est à peu près neutre au tournesol. Enfin stériliser à l'autoclave à 105 degrés pendant 15 minutes.

PROTÉOLYSE DANS LES CULTURES. — Nous nous sommes ensuite demandé qu'elle était l'influence de *l'âge des cultures* et de la *composition du milieu* sur le pouvoir protéolytique.

Nous avons pris plusieurs tubes contenant 10 cc. de bouillon de viande putréfiée, neutre au tournesol, privés d'air par un séjour de quelques minutes au bain-marie bouillant et additionnés de sulfure de calcium.

Nous les avonsensemencés avec 4 gouttes de cultures d'*Histolytique* ou de *Sporogène*, âgées de 24 heures d'étuve à 37 degrés.

Dans deux tubes témoins, nous avons dosé immédiatement l'azote titrable au formol. Nous avons placé les autres tubes à l'étuve à 37 degrés. Toutes les six heures pendant le premier jour, puis toutes les 24 heures, nous retirions deux tubes l'un de *Sporogène*, l'autre d'*Histolytique*; dans lesquels nous titrions également l'azote formol.

Les courbes ci-dessous schématisent les résultats obtenus. En abscisses, sont les temps (en heures) de séjour à l'étuve. En ordonnées, sont les valeurs en centimètres cubes de soude déci-

normale de l'azote titrable au formol, pour 10 centimètres cubes du milieu de culture. Nous n'avons représenté que la partie intéressante des courbes. Les dosages ont en effet été poursuivis jusqu'après le 13^e jour d'étuve.

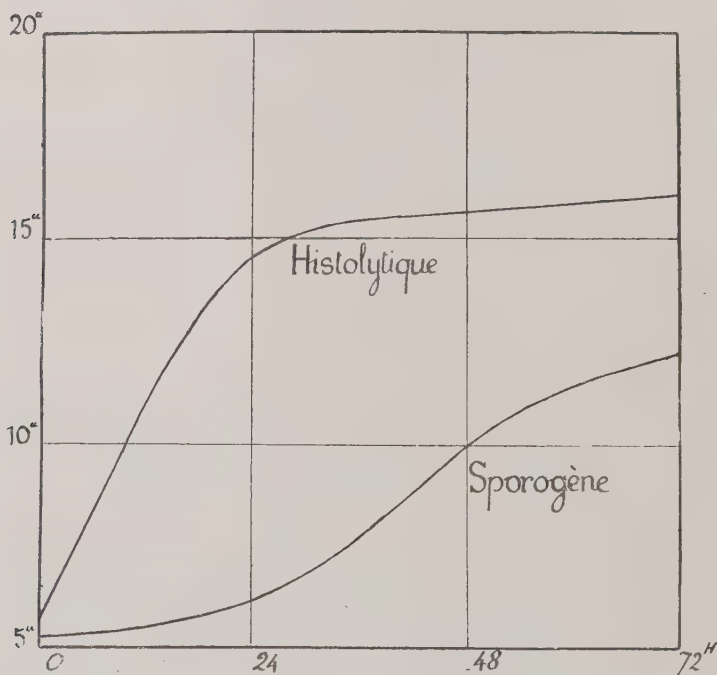


Fig. 1. — Protéolyse dans les cultures.

Nous remarquons sur ces courbes que la protéolyse est considérable pour le Sporogène à partir de la 40^e heure d'étuve et maxima à la 70^e heure.

Pour l'Histolytique, la production d'acides aminés est intense de la 15^e à la 24^e heure, par conséquent d'une façon beaucoup plus précoce. La protéolyse de l'Histolytique est aussi plus puissante.

Nous avons additionné nos milieux de culture, de glucose (0,50 à 1 0/0), de carbonate de chaux (0,50 0/0), de phosphate de potasse (1 0/0). La mesure de la protéolyse de nos deux

microbes dans ces différents milieux ne nous a pas donné des résultats intéressants. Le carbonate et le phosphate ont paru sans effet. L'Histolytique est sans action sur le glucose. Au contraire, ce sucre est attaqué fortement par le Sporogène dont le développement est favorisé.

Enfin, nous avons essayé de mesurer l'influence des *associations microbiennes* sur la protéolyse. Nous avons fait de nombreux ensemencements de divers Sporogènes et de divers Protées, aérobies très protéolytiques, tantôt en cultures communes, tantôt en cultures isolées. Nous avons trouvé dans tous les milieux une augmentation analogue des acides aminés; les actions digestives des divers microbes ne semblent pas s'ajouter. Les aérobies ne fournissent aucune aide pour la protéolyse des anaérobies, ils ne sont utiles que comme réducteurs, pour réaliser l'anaérobiose du milieu.

Il reste à déterminer quelle est la *concentration optima en ions H* permettant la culture de nos deux anaérobies. Cette question importante fait l'objet d'un chapitre spécial.

C. — ISOLEMENT DES FERMENTS

Les microbes agissent par leurs sécrétions. La manière la plus simple d'obtenir ces sécrétions est de filtrer sur bougie les cultures totales. Nous avons employé les bougies CHAMBERLAND F avec une pression négative de 40 centimètres de mercure, à une température de 18 à 20 degrés.

(1) HOLDERER a montré l'importance de la *réaction du milieu* dans la filtration des enzymes. C'est ainsi que la présure et la pepsine ne filtrent bien qu'en milieu neutre ou qu'en milieu acide à 2 0/0 d'acide chlorhydrique. La trypsine, elle, demande un milieu alcalin. La papaine passe en toutes réactions; de la neutralité au méthylorange à la neutralité à la phtaléine.

La réaction de filtration la plus favorable paraît donc être

celle-là même que réclame le ferment pour agir, légèrement acide pour le lab et la pepsine, alcaline pour la trypsine, indifférente pour la papaïne. Nous montrerons que c'est la neutralité au tournesol qui est favorable à nos microbes pour se développer, et à leurs ferments pour agir. Les cultures totales donnent approximativement cette réaction optima, il était donc indiqué de les filtrer telles qu'elles.

Mais devant certains résultats négatifs, nous avons recherché si une autre réaction ne serait pas plus favorable. Nous verrons plus loin que les filtrats normaux n'attaquent pas sensiblement l'ovalbumine crue. Nous avons filtré les cultures sous différentes réactions : neutralité au tournesol (réaction normale), neutralité à la phtaléine, neutralité au méthylorange, puis ramené tous les filtrats à la neutralité au tournesol. L'expérience nous a montré que le pouvoir digestif ne varie nullement et que par conséquent la réaction de filtration n'est pas en cause dans ce résultat négatif.

(2) Reste à trouver dans quelles conditions nous obtiendrons les ferments les plus puissants. Pour rechercher de quels facteurs dépend l'activité des extraits, nous avons fait varier les conditions de culture et le mode d'obtention des extraits. Nous avons éprouvé ensuite sur la gélatine leur pouvoir digestif.

(a) Nous avons déjà vu que, dans les cultures, la protéolyse est maxima après 24 heures pour l'Histolytique, après 72 heures pour le Sporogène. L'expérience ci-après montre que les filtrats les plus gélatinolytiques proviennent également des cultures âgées de 24 heures pour l'Histolytique, ou de 72 heures pour le Sporogène.

Nous avonsensemencé les deux microbes sur du bouillon de viande putréfiée et nous avons filtré les cultures sur bougie CHAMBERLAND F, après des temps de séjour variables à l'étuve à 37 degrés (de 6 heures à 10 jours). Nous avons recherché avec vingt gouttes de ces filtrats préalablement neutralisés au tournesol, le temps de contact à 37 degrés nécessaire pour amener la liquéfaction persistante à 12 degrés de 2 cc. de gélatine à 10 0/0. Le tableau ci-après représente les résultats obtenus.

nus. En abscisses, sont marqués les temps de séjour à l'étuve des différentes cultures totales d'où proviennent les filtrats. En ordonnées, est marqué le temps de contact à 37 degrés nécessaire pour la digestion complète de la gélatine.

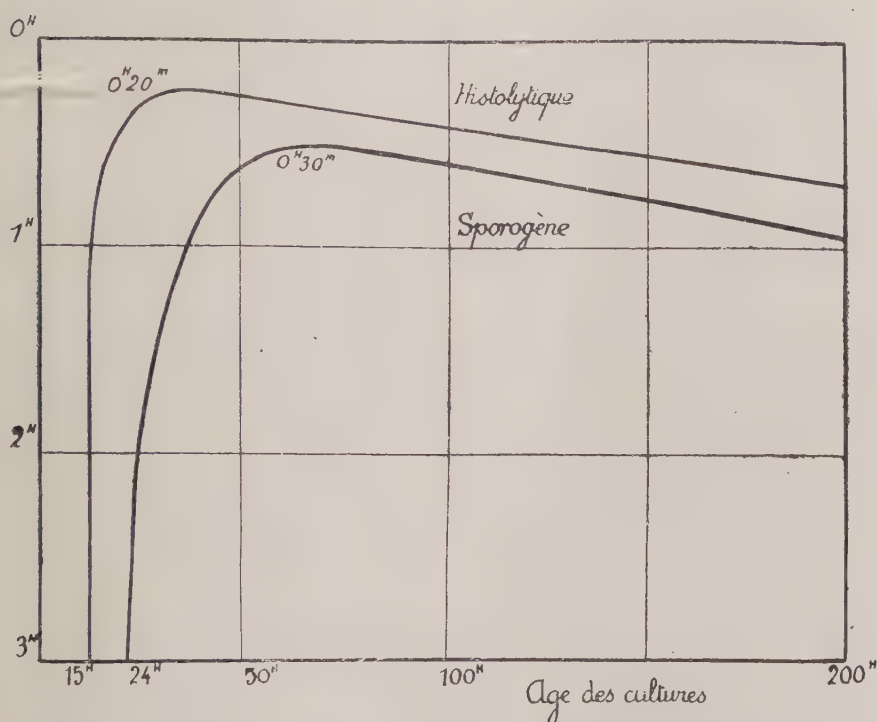


Fig. 2. — Influence de l'âge des cultures sur le pouvoir gélatinolytique des filtrats.

L'étude des courbes ci-dessus met en évidence l'optimum d'activité des deux filtrats, provenant pour l'Histolytique de cultures âgées de 24 heures, pour le Sporogène de cultures âgées de 72 heures. A la 15^e heure de culture pour l'Histolytique, à la 24^e heure pour le Sporogène, le pouvoir gélatinolytique est déjà important.

(b) Nous avons également mesuré l'activité gélatinolytique pour les filtrats de cultures sur milieux glucosés, carbonatés, phosphatés ou contenant des mélanges de ces substances, par

analogie avec ce que nous avons fait pour les cultures totales.

Pour l'Histolytique, nous n'avons pas trouvé de différences importantes. Le glucose paraît favoriser l'apparition du ferment, quoique ce sucre ne soit pas attaqué. Pour le Sporogène,

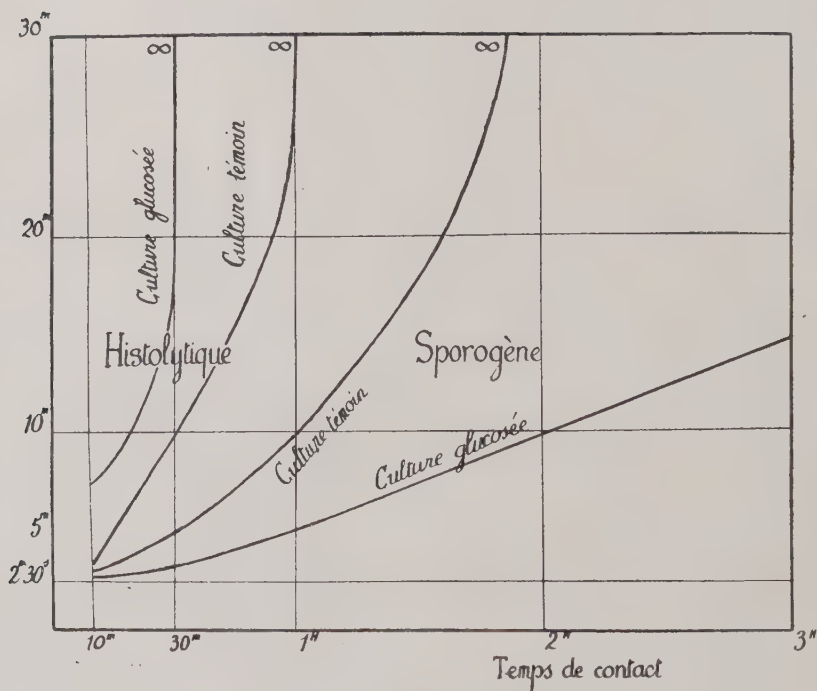


Fig. 3. — Influence de la composition du milieu de culture sur la production de gélatinases.

l'addition de glucose est nettement défavorable. Nous reproduisons les courbes d'action de deux filtrats normaux ou glucosés, ramenés à la neutralité au tournesol. En abscisses, sont les heures de contact au bain-marie à 37 degrés des filtrats et de la gélatine. En ordonnées, est portée la durée de l'état liquide à 12 degrés. Nous avons désigné par le signe ∞ la liquéfaction persistant 20 minutes à 12 degrés (digestion totale).

Le glucose est attaqué par le Sporogène. La culture est abon-

dante et la production de gaz augmente. Le ferment glycolytique se développe, le ferment protéolytique (gélatinase) a son activité diminuée. Ce balancement entre les productions des deux ferments relève sans doute d'une adaptation spécifique au milieu nutritif.

(c) Nous avons constaté précédemment que le pouvoir digestif des filtrats dépendait étroitement de l'âge des cultures dont ils dérivent. Ainsi, les filtrats de cultures très jeunes (moins de 6 heures) sont inactifs sur la gélatine. Le pouvoir digestif n'apparaît guère que vers la 10^e heure de culture ; il augmente rapidement avec l'âge de la culture pour demeurer après le 4^e jour à peu près stationnaire. Le ferment protéolytique ne se montre donc qu'après un certain nombre de divisions microbiennes et qu'après la mort d'une quantité plus ou moins grande de bacilles. Cette mort s'accompagne de la dégénérescence du corps bacillaire, de son autolyse. Ce phénomène intervient certainement dans l'apparition du ferment soluble microbien. Nous avons essayé d'augmenter artificiellement cette autolyse microbienne par l'action du chloroforme sur de jeunes cultures. Nous avons pu ainsi déterminer que la chloroformisation favorisait la libération du ferment digestif dans les cultures. Mais après un certain âge, 80 heures pour la culture du *b. sporogène*, 24 heures pour celle du *b. histolytique*, l'action favorisante du chloroforme disparaît.

EXPÉRIENCE. — Nous avons pris des cultures des deux microbes sur bouillon de viande putréfiée, additionné de sulfure de calcium et ayant 72 heures d'étuve pour le *Sporogène*, 15 heures d'étuve pour l'*Histolytique*. Dans chaque ballon de culture nous avons ajouté quelques centimètres cubes de chloroforme de façon à réaliser la saturation du milieu. Nous avons ensuite filtré sur bougie ces cultures après des temps variables de contact avec le chloroforme : 10 minutes, 1 heure, 6 heures, 24 heures, 48 heures. Nous avons répété la même expérience à différentes températures : 5 degrés, 18 degrés, 37 degrés.

Nous avons enfin mesuré le pouvoir digestif de 1 cc. de ces filtrats sur 2 cc. de gélatine à 10 0/0. Comme témoins, nous avons pris les cultures du même âge non chloroformées, filtrées après un séjour analogue à 5 degrés, 18 degrés, 37 degrés. Nous reproduisons ci-après un

résultat type de ces expériences. Nous avons fait agir le chloroforme à 18 degrés pendant des temps variables, de 10 minutes à 24 heures. Dans la troisième colonne, est indiqué le temps nécessaire au ferment pour la digestion totale de la gélatine. Plus ce temps est court, plus le ferment est actif.

**Influence de la durée de la chloroformisation des cultures
sur la gélatinase des filtrats.**

Filtrats (XV gttles)	Durée de la chloroformisation à 18°	Temps nécessaire pour la digestion
Sporogène (72 h.)	Témoin	2 h. 30
	10 minutes	0 h. 20
	1 heure	0 h. 30
	24 heures	0 h. 30
Histolytique (15 h.)	Témoin	5 h.
	10 minutes	1 h.
	1 heure	5 h.
	24 heures	5 h.

Nous voyons que les meilleurs résultats d'autolyse s'obtiennent par un contact très rapide : 5 à 10 minutes à 18 degrés.

Des séries d'expériences sur le même objet, nous ont démontré également que la température de 18 degrés était la plus favorable. Comme on pouvait s'y attendre, le séjour à la glacière retarde l'action du chloroforme, le séjour à l'étuve l'accélère.

Le chloroforme paraît libérer brusquement une certaine quantité de ferment, qui était en puissance dans les bacilles. Prolongée, l'action du chloroforme est nettement défavorable.

(d) Nous avons essayé d'isoler les *principes actifs* des filtrats en éliminant le plus possible les matières inertes par des précipitations. Les diastases sont entraînées par le précipité que l'on reprend ensuite par l'eau.

L'alcool-éther à parties égales ne nous a pas donné de bons résultats. Nous nous sommes servis de la précipitation par 6 volumes d'alcool à 96°. Le précipité floconneux était après

24 heures de contact desséché dans le vide, puis redissous dans l'eau de façon à réaliser une concentration de 20/1, vis-à-vis du filtrat primitif. Le liquide obtenu était filtré. Il présentait bien entendu, la réaction neutre au tournesol de l'eau qui avait servi à le préparer. Nous l'avons appelé *précipitat* pour le différencier du *filtrat* originel.

Nous n'avons pas trouvé de sérieux avantages à cette opération coûteuse et compliquée. Voici, par exemple, les pouvoirs digestifs comparés, dans le cas du Sporogène, de deux précipitats C2 et D2, et des deux filtrats C1 et D1 dont ils dérivent par une concentration de 20/1. Nous avons comparé l'activité des gélatinases, des labs, et des caséases, en prenant dans chaque cas pour unité le ferment du filtrat. La réaction des filtrats et des autolysats était analogue ($pH = 7,0$, selon la notation de SØRENSEN).

Le profit n'est pas suffisant pour nous faire suivre cette méthode.

Influence de la concentration des filtrats sur l'activité diastasique
B. Sporogenes.

Concentration	Gélatinase	Lab	Caséase
$\frac{C2}{C1} = 15$	3	1,5	2
$\frac{D2}{D1} = 20$	4	6	1,3

Nous avons essayé en vain de démontrer l'existence de l'*endodiastase*, libérée par l'autolyse. La centrifugation d'une culture jeune nous a donné un liquide clair ayant les mêmes propriétés que le filtrat lui-même. Le culot de centrifugation lavé rapidement, puis centrifugé à nouveau, mis en contact avec divers agents autolysants (chloroforme, eau distillée), nous a fourni un extrait inactif sur la gélatine.

Les corps microbiens dont on cherche la dislocation prennent

rapidement des formes de résistance (sporulées ou non) et sont dès lors réfractaires à l'autolyse.

RÉSUMÉ. — Tous ces essais nous indiquent que la méthode pratique pour obtenir des filtrats actifs est de cultiver chacun des deux anaérobies en bouillon de viande putréfiée, privé d'air par l'ébullition, additionné d'une pincée de sulfure de calcium, puis de filtrer ces cultures sur bougie après un séjour à l'étuve, de 24 heures pour l'Histolytique, de 72 heures pour le Sporogène (cette culture chloroformée 5 minutes à 18 degrés avant la filtration).

D. — LA QUESTION DES IONS H

Les liquides biologiques présentent chacun une réaction particulière liée à l'équilibre existant au sein de ces liquides entre les bases, les acides et leurs sels.

Pour déterminer cette réaction, les chimistes n'ont connu pendant longtemps que la méthode *titrimétrique* basée sur l'emploi de solutions titrées acides ou alcalines.

Mais les albuminoïdes contenus dans les liquides biologiques ont la propriété de fixer une certaine quantité d'acide ou d'alcali, et l'élément ainsi fixé ne joue plus aucun rôle dans les réactions de ces liquides. Seule, l'addition d'un acide (dans le cas d'un milieu alcalin), ou d'une base (dans le cas d'un milieu acide), peut libérer ces éléments de la matière protéique qui les immobilise. *C'est ce qui se produit* quand on mesure la réaction des milieux albuminoïdes au moyen de solutions titrées.

Chaque albuminoïde ayant un pouvoir de fixation différent, la méthode titrimétrique indique pour une même quantité d'élément libre actif des valeurs différentes d'acidité ou d'alcalinité, suivant la composition du milieu, et les résultats ne sont pas comparables.

Nous disposons de deux méthodes qui décèlent dans un

liquide les éléments acides ou alcalins libres et par conséquent actifs, à l'exclusion des éléments fixés par le milieu. L'une d'elles, la méthode *électrométrique*, détermine la différence de potentiel entre deux électrodes plongeant dans le liquide examiné. Mais cette méthode est longue et complexe, et a l'inconvénient de nécessiter un appareillage électrique spécial.

Bien plus commode, est une seconde méthode, due à SØRENSEN, pour mesurer la réaction des milieux sans tomber dans l'erreur du procédé titrimétrique. C'est la méthode *colorimétrique* ainsi nommée parce qu'elle utilise des séries de liquides appelés *indicateurs* qui changent de couleur pour un titre déterminé d'acidité ou d'alcalinité libre.

Cette dernière méthode est d'une technique rapide et commode. Nous allons en quelques lignes en décrire le principe et la technique.

I. LA CONCENTRATION EN IONS H. — La méthode colorimétrique permet de mesurer la concentration en ions hydrogène. Que signifie ce terme ?

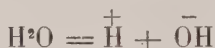
Rappelons-nous d'abord, la tendance actuelle de réserver aux ions (atomes chargés d'électricité) le rôle essentiel dans les réactions biologiques. Les propriétés si caractéristiques de l'état colloïdal, état sous lequel se trouvent les liquides biologiques, paraissent liées à l'existence d'ions dans la micelle colloïdale. Or, la réaction des liquides dépend uniquement de la quantité d'ions libres. On devine tout l'intérêt d'une méthode qui substitue à l'ancienne notation moléculaire d'acide ou d'alcali la donnée plus exacte d'ion libre et actif.

Les acides et les bases n'agissent que par leurs ions libres. Ce fait est connu depuis les travaux d'ARRHÉNIUS (1887) sur la dissociation. Un acide est constitué schématiquement par un ion métalloïde (caractéristique de l'acide), et par un ou plusieurs ions H, ion commun à tous les acides.

Pour chaque base, il existe, de la même façon, un ion métal spécifique, et un ou plusieurs ions OH communs à toutes les bases.

L'élément spécifique, métalloïde ou métal, n'intervient pas dans le caractère acide ou alcalin. Les éléments H et OH, au contraire, par leur présence en plus ou moins grande quantité, déterminent la réaction plus ou moins acide, plus ou moins alcaline du liquide qui les renferme. En mesurant la quantité d'ions H ou OH libres dans une solution, on peut, par conséquent, mesurer exactement son titre acide ou alcalin. Nous voyons ainsi apparaître le terme de concentration en ions (H ou OH).

Ces deux catégories d'ions H et OH existent toujours dans les liquides biologiques, parce que ces liquides sont des milieux aqueux, et que la dissociation de l'eau pure H^2O donne elle-même naissance aux deux catégories d'ions acide H, alcalin OH



S'il n'y a pas de substance étrangère dissoute dans cette eau pure, les ions H et OH se neutralisent exactement. Toute substance acide ou alcaline dissoute dans l'eau apportera au contraire des ions H ou OH en supplément et changera l'équilibre primitif.

Mais, pour toute solution aqueuse, il existe une relation fixe entre les quantités d'ions H ou OH à l'état libre dans le liquide. En effet, le produit des concentrations respectives de ces deux ions est une valeur constante :

$$\text{concentr. H} \times \text{concentr. OH} = K$$

Cette valeur fixe K est appelée constante de dissociation. L'équation ci-dessus, qui est en réalité un peu plus complexe, a été établie pour l'eau pure. Quand on dissout une substance acide ou alcaline dans cette eau et que l'équilibre des ions est modifié, cette équation demeure encore exacte, et le produit $H \times OH$ est encore constant et égal à K.

Si l'on connaît la valeur de K, et la concentration en ions H d'une solution, on peut donc facilement calculer la concentration en ions OH, et réciproquement.

Or, on détermine la concentration en ions H avec plus d'exactitude et de commodité que la concentration en ions OH. Aussi, en pratique, définit-on la réaction d'un liquide par sa concentration en ions H, même lorsqu'il s'agit d'une solution alcaline pour laquelle les ions OH sont prépondérants et semblent seuls intéressants. Il est toujours facile, en effet, de déduire cette dernière concentration lorsqu'on connaît la constante K et la concentration en ions H.

On a choisi comme unité de concentration en ions H la solution normale en *ion hydrogène*, contenant un gramme d'hydrogène par litre (solution aqueuse).

Si nous avons une solution contenant par exemple : 0 gr. 001 d'hydrogène par litre, sa concentration mille fois plus petite que la concentration normale N, s'écrira 0,001. On désigne les concentrations en ions H par la lettre H :

$$H = 0,001 = \frac{1}{10^3}.$$

On emploie souvent pour représenter la concentration en ions H un autre symbole dérivé du premier H, c'est *le symbole pH* (SØRENSEN, 1909).

Le symbole H indique, comme nous l'avons vu, la concentration en ions H d'une solution quelconque par rapport à la solution normale N :

$$H = \frac{N}{10^x},$$

et, comme N est égal à 1 :

$$H = \frac{1}{10^x}.$$

Voici maintenant les raisons pour lesquelles on a dû changer cette notation. Supposons deux solutions de concentration 10^{-7} et 10^{-8} . La première est 10 fois plus concentrée que la deuxième. Essayons de choisir deux autres solutions quelconques de façon que la première soit encore 10 fois plus concentrée que la deuxième ; par exemple des solutions de concentration 10^{-4} , et 10^{-5} . Ces deux groupes de solutions présentent

donc les mêmes différences de valeurs. Or, si nous voulons représenter ces quatre différentes concentrations sur un même graphique, nous nous heurtons à de grandes difficultés du fait que les deux premières sont mille fois plus petites que les deux dernières, et n'occuperont sur le graphique que des intervalles infimes si l'on ne veut pas donner aux deux dernières des valeurs représentatives démesurées. Rien ne pourra nous indiquer enfin que leurs différences de valeurs prises deux à deux sont équivalentes.

Le graphique représentant ces concentrations sera au contraire d'exécution facile et d'interprétation correcte si l'on remplace les valeurs absolues des concentrations par leur exposant : 7 et 8, et 4 et 5. Cet exposant indique pratiquement le logarithme de l'inverse de la concentration en ions H. On le désigne par le symbole *pH* :

$$pH = \log \frac{1}{H}.$$

Cette notation a donc été établie simplement pour la commodité du calcul, et non pas pour représenter une loi logarithmique. Ajoutons cependant, que par la méthode électrométrique, on obtient directement cette valeur $\log \frac{1}{H}$.

II. LA MÉTHODE COLORIMÉTRIQUE. — Le principe de cette méthode est de colorer la solution à examiner au moyen de liquides spéciaux appelés indicateurs. En même temps, on colore de la même manière des liquides de comparaison dont la concentration est connue et se rapproche de la concentration supposée de la solution à titrer. En comparant les teintes, il est facile de trouver le liquide de comparaison ayant la même couleur c'est-à-dire la même concentration en ions H que la solution examinée.

Le matériel d'expérience se compose :

- A. d'une série d'indicateurs,
- B. d'une série de liquides étalons.

A. *Les indicateurs.* — Les indicateurs sont des bases ou des

acides polyatomiques dont la dissociation met en évidence des ions colorés. Ils présentent ainsi des colorations différentes suivant la concentration en ions H des milieux auxquels ils sont ajoutés. Par exemple, la solution de *rouge de crésol*, jaune pour les concentrations inférieures à $pH = 7,2$, est rouge vif pour les concentrations supérieures à $pH = 8,8$. Dans l'intervalle, la solution présente des colorations intermédiaires entre le jaune et le rouge vif. D'où une gamme de teintes s'échelonnant pour les valeurs de pH comprises entre 7,2 et 8,8. Au moyen de cette gamme de couleurs, il est facile de déterminer la concentration en ions H d'une solution dont la concentration exprimée en pH est comprise entre 7,2 et 8,8. Avec d'autres indicateurs dont les points de virage seront différents, nous pourrions déterminer les solutions dont la concentration est inférieure ou supérieure à ces valeurs.

Pour justifier le principe de la méthode colorimétrique, les indicateurs ne doivent être modifiés que par les ions libres. Les matières protéiques et les sels neutres des milieux ne doivent exercer aucune influence néfaste sur leur virage. Il est assez difficile de trouver des indicateurs réalisant absolument cette condition. Après de longues expériences, SØRENSEN (1908-1909), puis CLARK et LUBS (1917) ont décrit des séries d'indicateurs dont les points de virage s'échelonnent entre $pH = 1,0$ et $pH = 10,0$, seules valeurs que l'on utilise en pratique.

B. Les solutions étalons. — Les liquides de comparaison doivent être choisis avec un soin particulier pour que leur concentration en ions H demeure invariable. On a constaté depuis longtemps que les mélanges de sels acides avec des sels neutres (phosphates, carbonates) de même que les mélanges des protéines avec leurs produits de décomposition, faisaient l'office de régulateurs en s'opposant aux variations de la concentration en ions H. Ce sont là les substances *tampons*. Ces mélanges de concentration très fixe sont propres à servir de solutions étalons.

TECHNIQUE DE LA MÉTHODE. — Possédant les indicateurs et une série de liquides étalons, il est très facile de déterminer la concentration en

ions H d'un liquide. Un essai préalable du liquide à examiner montre grossièrement l'ordre de grandeur de la concentration en ions. On prend les séries de tubes étalons qui encadrent cette valeur supposée. On utilise bien entendu des tubes de verre clair absolument comparables de forme et de dimensions, remplis avec la même quantité de liquide (solution inconnue ou liquide étalon). On ajoute à tous les tubes V à X gouttes de l'indicateur convenable. On n'a plus qu'à comparer les teintes et à noter la concentration du tube étalon dont la teinte est la même que celle du liquide examiné. On peut se procurer les liquides de comparaison déjà colorés (et correspondant à un indicateur déterminé). On peut encore colorer les mélanges de phosphates, servant d'étalons, en même temps que le liquide à titrer.

Si l'on titre un liquide légèrement coloré, la superposition des couleurs dans le liquide à titrer rend toute comparaison impossible avec les liquides étalons. On remédie à cet inconvénient en plaçant au-devant du liquide étalon un tube contenant du liquide à titrer non additionné d'indicateur, tandis qu'on place derrière le liquide à titrer additionné d'indicateur un tube contenant de l'eau pure. Ainsi, le faisceau lumineux fait dans les deux cas le même trajet.

Les solutions troubles ou très colorées, ne sauraient être dosées directement. On a remarqué heureusement, que les dilutions des liquides biologiques changeaient peu leur concentration en ions H, parce qu'ils renferment tous des quantités notables de substances tampons qui s'opposent aux variations de cette concentration. Pratiquement, la dilution du liquide à titrer dans cinq fois son volume d'eau pure ne change guère la valeur de son indice pH . Par ce moyen, on arrive en général à pouvoir titrer les liquides troubles ou très colorés.

Nous allons appliquer cette méthode à la recherche des limites et de l'optimum de croissance des deux microbes qui nous intéressent.

CONCENTRATION OPTIMUM EN IONS H DES MILIEUX DE CULTURE POUR LE SPOROGENÈ ET L'HISTOLYTIQUE.

Expérience. — Nous avons d'abord préparé des milieux de culture de concentration variable en ions H. Le bouillon de viande putréfiée que nous avons utilisé titrait $pH = 5,0$. A 10 cc. de ce bouillon nous avons ajouté 0 cc. 5 de sel marin à 1/40, des quantités variables d'acide chlorhydrique normal ou de soude normale, et enfin de l'eau physiologique, de façon à réaliser un volume constant de 12 cc. 5.

Par la méthode colorimétrique, nous avons calculé ensuite la concentration en ions H de ces tubes et nous avons réalisé une série dont l'indice *pH* variait entre 3,0 et 9,0.

Préparation de milieux de concentration variable en ions H.

Nos des tubes	cc. N/1 NaOH	cc. N/1 HCl	H ² O	<i>pH</i> calculé
1	—	1,8	0,2	3,0
2	—	1,0	1,0	4,0
3	—	—	2,0	5,0
4	0,3	—	1,7	6,0
5	0,6	—	1,4	6,5
6	1,0	—	1,0	7,0
7	1,2	—	0,8	7,5
8	1,4	—	0,6	8,0
9	1,7	—	0,3	9,0

Pour l'ensemencement, nous avons stérilisé ces tubes à 110 degrés, puis nous les avons additionnés d'une pincée de sulfure de calcium pour réaliser une atmosphère privée d'oxygène. Sur une série de tubes témoins, nous avons vérifié que ni la stérilisation, ni l'addition de sulfure ne modifiaient d'une façon sensible la concentration en ions H. Nous avons ensemencé à 40 degrés les tubes de bouillon avec trois gouttes de culture de 24 heures de Sporogène ou d'Histolytique. Après

Développement des deux microbes en fonction de *pH*.

<i>pH</i> initial	Sporogène O		Histolytique	
	<i>pH</i> final	Degré de croissance	<i>pH</i> final	Degré de croissance
3,0	3,5	1	3,5	1
4,0	4,0	1	4,0	1
5,0	5,5	2	5,5	1
6,0	6,0	3	6,0	2
6,5	6,5	4	6,5	3
7,0	7,0	4	7,0	4
7,5	7,5	4	7,5	4
8,0	8,0	3	8,0	3
9,0	9,0	0	9,0	0

24 heures, nous avons déterminé approximativement le degré de croissance (opacité de la culture comparée à des tubes étalons) et mesuré l'indice pH final par la méthode colorimétrique. Les résultats sont donnés dans les tableaux ci-dessous. Les degrés de croissance 1, 2, 3, 4... correspondent grossièrement à 100.000, 200.000, 300.000... bactéries au centimètre cube.

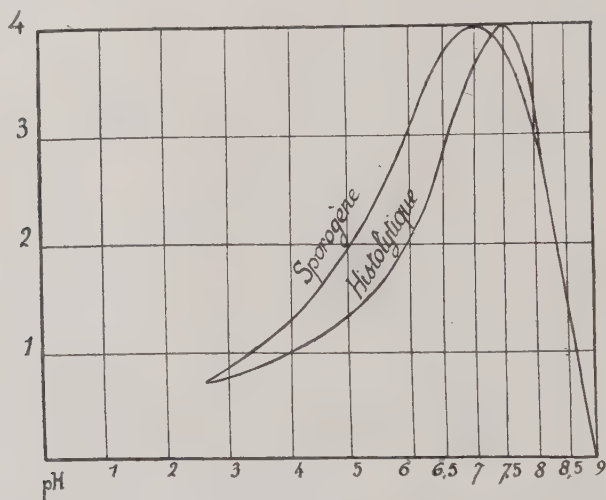


Fig. 4. — Courbes de croissance des microbes en fonction de pH .

Les deux bacilles Histolytique et Sporogène ont à peu près la même courbe de croissance en fonction de l'indice pH du milieu. Une acidité relativement forte ($pH = 3,0$) n'empêche pas le départ de la culture, mais le développement s'arrête vite. Au contraire, l'alcalinité du milieu ($pH = 9,0$) arrête tout développement. L'optimum est obtenu pour un indice pH voisin du point neutre ($pH = 6,5$ à $7,5$).

Après 24 heures d'étuve à 37 degrés, la concentration en ions H n'a pas varié. Plus tard, elle baisse lentement (par production d'ammoniaque). Nous avons réalisé pour nos expériences de protéolyse des bouillons de culture dont la concentration variait entre $pH = 7,0$ et $pH = 7,6$. Les filtrats que nous avons obtenus avec les cultures pratiquées sur ces milieux possédaient une concentration analogue de 7,0 à 7,6.

Ces concentrations correspondent à un optimum de développement pour les deux bacilles Sporogène et Histolytique. Quand nous avons voulu réaliser *in vitro* les conditions de la protéolyse normale de ces deux microbes, il nous a suffi, par conséquent, de mettre les filtrats décrits ci-dessus au contact des diverses matières protéiques.

IV

DIGESTION *IN VIVO*

A. — INJECTIONS DES CULTURES OU DES FILTRATS DANS LES MUSCLES DU COBAYE

Notre travail a pour point de départ la constatation de la myolyse dans la gangrène gazeuse, et le souci de voir si ce phénomène peut s'expliquer par une digestion microbienne.

Personne n'a montré jusqu'ici que les anaérobies sont capables de réaliser et *in vivo* et *in vitro* cette fonte musculaire.

Pour nous assurer d'abord de la réalité du phénomène digestif, nous avons reproduit sur l'animal les lésions des gangrènes en injectant l'un ou l'autre des deux microbes Sporogène ou Histolytique dans l'épaisseur des muscles.

Nous avons utilisé des cultures pures pour ne pas compliquer cette étude de la question si discutée des associations entre anaérobies ou entre aéro-anaérobies. Nous avons eu raison puisque nos microbes se sont montrés isolément aptes à réaliser les lésions recherchées.

Enfin, en injectant seulement des doses faibles, nous avons tâché d'éviter l'intervention du facteur toxicité, pour ne conserver que l'action protéolytique locale.

Injection des cultures. — Les phénomènes accompagnant l'injection des cultures vivantes diffèrent pour les deux microbes.

EXPÉRIENCE

Dans les muscles de la fesse d'un cobaye mâle de 550 gr., nous avons injecté 1 cc. de culture d'Histolytique Agée de 24 heures. Le tableau ci-dessous montre l'évolution du poids et de la température rectale après l'injection.

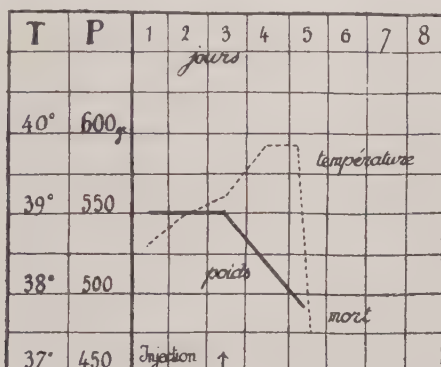


Fig. 5. — Injection intra-musculaire de B. Histolytique.

Déjà 6 heures après l'inoculation, on observe un œdème violacé au point injecté. Le cobaye est agité, a des soubresauts. Après 24 heures, la patte est raide, immobile, insensible. L'œdème local est dur, sans décollement gazeux. La peau mortifiée se détache facilement, laissant apparaître des tissus violacés. L'exsudat est légèrement alcalin au tournesol, non putride.

Quelques heures encore, et l'on observe une plaie profonde et sanieuse, intéressant la totalité des masses charnues. Les muscles sont en bouillie, les tendons intacts tranchent par leur coloration blanche, l'articulation se dessine. Le cobaye est froid, a de la diarrhée. Les poils de la région abdominale se laissent facilement arracher.

L'animal est alors sacrifié. A l'autopsie, pas de sérosité péronéale, les viscères sont rouges, congestionnés. Les poulmons

sont pâles, avec des taches hémorragiques punctiformes. Le sang du cœur renferme le *B. histolyticus*.

Dans le cas du Sporogène, nous n'avons jamais obtenu de résultat analogue. Nous avons injecté, par exemple, 1 cc. de culture de Sporogène âgée de 24 heures dans la fesse d'un cobaye mâle de 365 gr. Le tableau ci-après représente les courbes du poids et de la température.

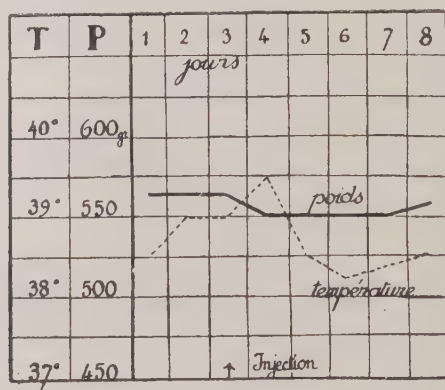


Fig. 6. — Injection intra-musculaire de *B. sporogenes*.

Nous voyons que le cobaye réagit peu. Le poids ne baisse pas, l'animal ne présente pas de tache hémorragique, pas d'escharre au point d'injection. La boule d'œdème dur produite par l'injection se résorbe lentement. Le cobaye est en excellent état au 5^e jour.

C'est un résultat négatif. Nous avons alors cherché à favoriser la protéolyse du Sporogène en mortifiant d'avance la zone inoculée. Nous y étions autorisés par le fait que la gangrène gazeuse n'apparaît ordinairement qu'après une attrition musculaire importante avec lésions vasculaires ou osseuses. Nous avons utilisé dans ce but l'instillation de quelques gouttes d'acide lactique en plein muscle.

Nous nous sommes préalablement assurés que l'injection intra-musculaire de quelques dixièmes de centimètre cube d'acide lactique pur n'amenait pas d'escharre profonde.

A l'aide de cette dissociation préalable des fibres musculaires par l'acide lactique, le Sporogène produit une perte de substance. La guérison est habituelle avec rétraction musculaire et atrophie du membre.

Il se forme d'abord un gros abcès avec décollement, dans lequel les bacilles pullulent. La peau s'épaissit, puis l'abcès se fistulise, donnant issue à un pus crémeux, jaune, sanglant, fétide. La fistule ne guérit qu'à la longue.

Parfois, au contraire, l'abcès n'a pas tendance à s'ouvrir spontanément. A l'incision on constate qu'une partie des masses musculaires a disparu liquéfiée. L'animal conserve un bon état général. Le tableau ci-dessous représente la courbe du poids d'un cobaye femelle de 985 gr. ayant reçu dans les muscles de la fesse 0 cc. 2 d'acide lactique pur, puis 2 cc. de culture totale de Sporogène âgée de 24 heures.

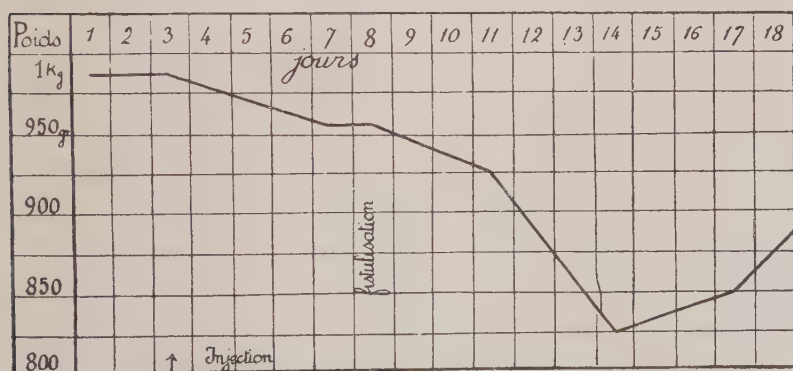


Fig. 7. — Injection intra-musculaire de Sporogène après dénaturation par l'acide lactique.

Pendant la première semaine le poids ne varie pas. Plus tard le volumineux abcès qui se formait se vide lentement. Le poids baisse sans que l'état général soit altéré. Enfin, au bout de 6-7 semaines, la fistule se tarit, l'animal est redevenu normal. En présence d'un muscle altéré par l'acide lactique, le Sporogène produit donc une lyse musculaire indéniable.

Injection des filtrats. — L'injection intra-musculaire des

Quelques heures après l'injection, la patte est immobile, insensible, chaude, oedématisée. La fluctuation fait prévoir

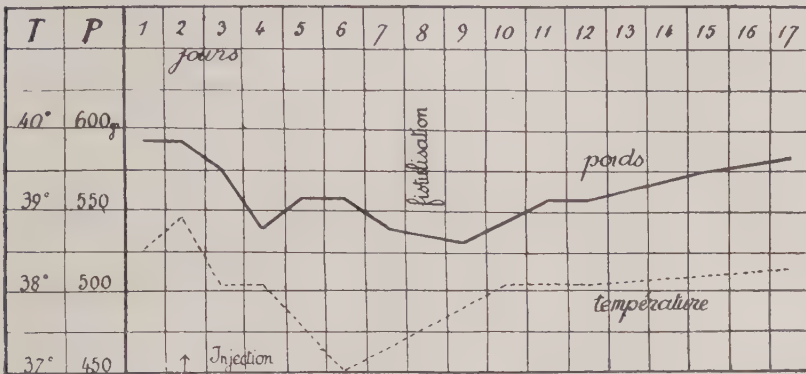


Fig. 9. — Histolytique. Injection intra-musculaire de filtrat après instillation d'acide lactique.

l'escharre qui apparaît une semaine après. La hanche reste mobile. La plaie est profonde avec un étroit pertuis. Pas de gaz ni de putridité. Le pus renferme du *B. proteus* et des Staphylocoques (infection exogène). La fistule se ferme lentement, l'état général reste bon.

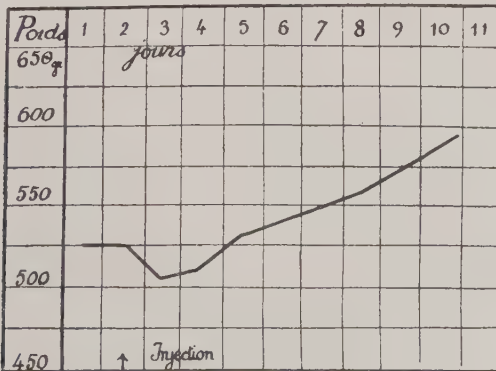


Fig. 10. — Sporogène. Injection intra-musculaire de filtrat après instillation d'acide lactique.

Enfin, dans le cas des injections intra-musculaires de filtrat de Sporogène, précédées ou non d'instillation d'acide lactique, aucun phénomène pathologique n'est obtenu.

La courbe de poids ci-dessus concerne un cobaye mâle de 530 gr. ayant reçu dans la fesse 0 cc. 2 d'acide lactique pur et ensuite 3 cc. de filtrat neutre ($pH = 6,7$) d'une culture de Sporogène âgée de 50 heures.

Au deuxième jour après l'injection, la patte est immobile avec un léger œdème et une escharre hémorragique en surface au point d'inoculation. Au quatrième jour, la patte traîne, la boule d'œdème a diminué, l'escharre guérit. Au sixième jour, la guérison est complète.

B. — POUVOIR HÉMOTOXIQUE

La liquéfaction des tissus s'accompagne ordinairement de lésions hémorragiques, suffusions sanguines superficielles ou profondes. Aussi, avons-nous recherché soigneusement l'existence, pour nos deux microbes, d'un pouvoir hémolytique en relation avec la mortification des tissus.

In vivo, remarquons de suite qu'il n'est jamais apparu d'hémoglobinurie, et que le sang est resté normal de couleur et de consistance. *In vitro*, le pouvoir hémolytique existe, mais très faible.

POUVOIR HÉMOLYTIQUE DES CULTURES. — Nous avons pris des tubes de 10 cc. de bouillon de viande putréfiée, additionné de traces de sulfure de calcium. Ces tubes étaientensemencés avec 4 gouttes de cultures de 24 heures d'Histolytique ou de Sporogène, puis placés pendant 4 jours à 37 degrés. Au bout de ce temps, nous avons ajouté à chaque tube 10 cc. de globules rouges de mouton, lavés, dilués à 5 0/0. Le mélange fait, nous avons remis à l'étuve à 37 degrés et examiné les tubes après 6 heures, 12 heures, 24 heures et 48 heures.

Dans ces cultures additionnées de globules rouges, on constate, dans le cas du Sporogène, l'apparition d'une colora-

tion brunâtre (méthémoglobine) 10 minutes après le mélange. L'hémolyse totale pour l'Histolytique, partielle pour le Sporogène, ne se montre qu'après 48 heures. L'examen du dépôt fait constater pour l'Histolytique des globules déformés mais reconnaissables, donnant l'impression de sacs vides. Pour le Sporogène, le dépôt est constitué par des globules à demi-digérés avec des contours diffus, l'hémoglobine forme des taches irrégulières.

POUVOIR HÉMOLYTIQUE DES FILTRATS. — Nous avons ajouté des globules rouges de mouton, lavés et dilués à 5 0/0, à des filtrats d'Histolytique (culture de 24 heures) ou de Sporogène (culture de 72 heures). Pour 1 cc. de filtrat neutre ($pH = 7,0$), nous avons mis des doses de globules rouges variant de 0 cc. 1 à 1 cc. Pour déterminer le pouvoir hémolytique nous avons suivi la méthode d'EHRlich, qui consiste à placer le mélange système hémolytique-globules une heure au bain-marie à 37 degrés, puis 20 heures à 18 degrés (température du laboratoire).

Nous avons examiné aussitôt après, les tubes en expérience, sans constater nulle part d'hémolyse même partielle. Les filtrats paraissent donc dépourvus de pouvoir hémolytique.

Nous allons maintenant étudier la protéolyse proprement dite des cultures et des filtrats. Au contraire du pouvoir hémolytique faible des deux microbes leur pouvoir protéolytique est très puissant. Ce fait ne doit pas surprendre. BEAUJAN a démontré depuis longtemps qu'il n'y a aucune relation entre l'hémolyse proprement dite et la protéolyse.

V

DIGESTION DU MUSCLE *IN VITRO*

Dans les pages précédentes, nous avons montré que le muscle vivant se laissait digérer par les deux microbes Histolytique et Sporogène, à condition de faire intervenir pour ce dernier, une certaine dénaturation tissulaire.

Nous allons, cette fois *in vitro*, essayer de renouveler ces expériences. Nous démontrerons ainsi l'intervention *réelle* des ferments digestifs microbiens et nous pourrons en mesurer l'activité.

Nous avons mis dans les cultures ou dans les filtrats un lambeau musculaire et nous en avons noté la fonte macroscopique. Ce muscle était soit cru, soit dénaturé par les acides, les alcalis ou par la chaleur. Pour nous assurer que la fonte musculaire était bien due à une digestion, nous avons déterminé la nature des produits formés. Enfin, nous avons mesuré l'étendue de la protéolyse musculaire.

Nous étions tenté d'étudier cette digestion sur des macérations de muscle ou simplement sur la fibrine. La mise en train et l'interprétation des expériences nous paraissaient plus aisées. Mais nous nous serions trop éloigné des conditions de la myolyse *in vivo*. De plus, la fibrine crue se laisse digérer si facilement que les résultats des recherches pratiquées avec cette substance sont très contestables.

Aussi, comme tests de digestion, avons-nous pris de petits lambeaux de muscle prélevés aseptiquement sur les masses fessières du cobaye tué par saignée. Nous avons appelé diges-

tion totale, la fonte macroscopique de ces lambeaux en une bouillie visqueuse et grisâtre, se résolvant par l'agitation en grumeaux, puis se solubilisant peu à peu.

Nous avons étudié l'action digestive des cultures et des filtrats d'abord sur le muscle cru, puis sur le muscle dénaturé.

A. — DIGESTION DU MUSCLE DANS LES CULTURES TOTALES

I. MUSCLE CRU. — *Expériences.* — Nous avons pris des cultures totales, à l'air libre, de Sporogène ou d'Histolytique, ayant une concentration en ions H de $pH = 7,5$ et âgées de 5 heures d'étuve à 37 degrés. A ces cultures, nous avons ajouté des lambeaux musculaires de cobaye. Ces lambeaux étaient prélevés dès la mort de l'animal par saignée et employés, soit tels quels, soit lavés 30 minutes dans l'eau physiologique, soit enfin hachés.

Le Sporogène n'a pas d'action sur les lambeaux de muscle cru. Nous avons laissé plusieurs mois des fragments cubiques de 1 centim. dans les cultures vivantes sans constater de fonte appréciable. La surface musculaire demeure rouge, luisante, et résiste à la dislocation. Le lavage préalable du lambeau dans de l'eau salée à 9 p. 1.000 ne change rien. Mais la dissociation du tissu (émiettement, hachage) permet au contraire une fonte rapide. Il existe donc pour le Sporogène un ferment myolytique, mais son activité est médiocre. L'action de la dissociation nécessaire pour la fonte du muscle a des effets comparables à l'action de l'instillation d'acide lactique, également nécessaire pour amener la nécrose des tissus lorsqu'on injecte les cultures de Sporogène à l'animal.

L'Histolytique, au contraire, conserve les propriétés digestives qu'il avait si prononcées *in vivo*. Le muscle dissocié est évidemment digéré le plus vite, en 24 heures. Le muscle cru fond en 48 heures, le muscle lavé en 3 jours. Le lambeau perd rapidement ses formes régulières pour devenir une masse grise, floconneuse. Si l'on agite le tube, il se développe une

spirale de matière visqueuse contenant des grumeaux. Ceux-ci disparaissent enfin, et il reste une poussière qui se solubilise lentement. L'Histolytique possède donc un ferment très puissant qui solubilise le muscle crû.

II. MUSCLE DÉNATURÉ PAR LA CHALEUR. — Le chauffage préalable des lambeaux musculaires empêche leur digestion par l'Histolytique. Le muscle chauffé une demi-heure à 60 degrés demande trois fois plus de temps que le muscle cru pour être solubilisé. Le muscle bouilli, même dissocié, reste réfractaire à toute digestion microbienne.

Le Sporogène ne digère pas plus le muscle chauffé qu'il ne digérait le muscle cru.

Comme précédemment, nous avons utilisé pour nos expériences des cultures totales, âgées de 5 heures à 37 degrés, auxquelles nous ajoutons des lambeaux musculaires chauffés au bain-marie, dans de l'eau salée à 9 p. 1.000, soit une demi-heure à 60 degrés, soit 10 minutes à 100 degrés.

III. MUSCLE DÉNATURÉ PAR LES ACIDES OU PAR LES ALCALIS. — Certains ferments protéolytiques (type pepsine) n'agissent qu'en présence d'acides. Aussi avons-nous essayé de faire agir l'acide chlorhydrique ou l'acide lactique sur le muscle cru ou bouilli avant de soumettre les lambeaux musculaires à l'action des deux microbes Histolytique et Sporogène.

Nous avons laissé séjourner les lambeaux de muscle crus, ou bouillis, 20 minutes dans l'acide chlorhydrique décinormal ou dans l'acide lactique décinormal. Nous avons ensuite neutralisé l'acide par le passage des lambeaux dans la soude décinormale pendant 5 minutes, puis par le lavage pendant 5 minutes dans l'eau physiologique. Nous avons ensuite placé le muscle dans les cultures microbiennes.

Cette dénaturation par les acides ne favorise nullement la digestion du muscle par les deux microbes. Nous avons seulement remarqué la dislocation du tissu musculaire en fibrilles qui demeurent intactes. Le muscle cru ou chauffé, dénaturé par l'acide n'est donc pas solubilisé par les deux microbes.

Nous avons recherché par symétrie l'action des alcalis. Nous avons placé les lambeaux musculaires 20 minutes dans de la soude décinormale, nous les avons ensuite lavés 5 minutes dans l'acide chlorhydrique décinormal, puis 5 minutes dans l'eau physiologique. Ces fragments ainsi traités étaient enfin ajoutés aux cultures totales.

Dans la culture de Sporogène, le muscle cru traité par la soude se gonfle, devient transparent, flotte à la surface du liquide. Le muscle bouilli, puis traité par la soude, n'est aucunement modifié.

L'Histolytique, au contraire, solubilise entièrement le muscle traité par la soude, et plus complètement le muscle cru que le muscle bouilli. Mais l'ébullition préalable dans la soude décinormale rend le muscle réfractaire à la solubilisation.

Le séjour préalable dans un milieu alcalin paraît donc favoriser la digestion du tissu musculaire par l'Histolytique. Le Sporogène a dans tous les cas une action nulle sur les lambeaux de muscle.

B. — DIGESTION DU MUSCLE DANS LES FILTRATS

Nous avons répété avec les filtrats des cultures microbiennes les mêmes expériences que nous avons effectuées sur les cultures totales. Nous avons obtenu des résultats comparables.

I. DIGESTION DU MUSCLE CRU. — Nous avons pris des cultures sur bouillon de viande putréfiée, âgées de 72 heures pour le Sporogène, de 24 heures pour l'Histolytique, et filtrées cultures sur bougie CHAMBERLAND F. Nous avons utilisé trois séries de filtrats :

Filtrat normal ($pH = 7,0$),

Filtrat alcalin ($pH = 8,0$),

Filtrat bouilli, témoin.

A ces filtrats, nous avons ajouté les lambeaux de muscle (de 0 cm. 5 de côté, prélevés aseptiquement sur les masses fessières du cobaye tué par saignée).

Nous avons mis dans tous les tubes une couche de toluène pour éviter la contamination du milieu, et nous les avons placés à l'étuve à 37 degrés.

Résultats. — Les filtrats de Sporogène n'ont aucune action sur le muscle. Le lambeau se gonfle, devient transparent, mais ne disparaît pas. Au contraire, le filtrat d'Histolytique a une action puissante sur le muscle cru. En 30 heures le tissu est solubilisé, et il apparaît dans le liquide des peptones mises en évidence par la réaction du biuret.

Une réaction alcaline ($pH = 8,0$) paraît plus favorable qu'une réaction neutre ($pH = 7,0$).

Les filtrats bouillis montrent un phénomène sur lequel nous reviendrons, ils donnent un précipité opalescent au contact du suc musculaire.

II. DIGESTION DU MUSCLE DÉNATURÉ. — Pour dénaturer le muscle, nous avons utilisé la chaleur (ébullition pendant 10 minutes au bain-marie à 100 degrés), les acides (séjour de 30 minutes dans l'acide chlorhydrique ou dans l'acide lactique décinormaux, neutralisation par la soude décinormale, lavage dans l'eau physiologique) ou enfin les alcalis (séjour dans la soude décinormale, neutralisation par les acides, lavage). Nous avons employé les mêmes filtrats microbiens que précédemment.

Nos filtrats n'ont jamais solubilisé les lambeaux de muscle dénaturé. Le séjour dans la soude qui permettait à la culture d'Histolytique l'attaque plus facile du tissu musculaire, est demeuré sans effet pour le filtrat de ce microbe. Parfois il se produit un effilochage du muscle, mais les fibrilles restent intactes. Enfin, la réaction du biuret demeure dans tous les cas négative.

Le muscle dénaturé n'est donc attaqué par aucun des deux filtrats.

C. — RECHERCHE DES PRODUITS DE DIGESTION

I. DANS LES CULTURES. — Dans les cultures d'Histolytique le muscle cru subit une fonte totale. Le Sporogène ne fait disparaître que le muscle cru préalablement dissocié. Il était indis-

pensable de rechercher à quels produits aboutit cette fonte macroscopique. Malheureusement, on est obligé pour permettre le développement normal des microbes d'utiliser le bouillon, ou bien un autre milieu liquide. Or, il est impossible de séparer les actions digestives du microbe d'une part sur ce bouillon, d'autre part sur le lambeau musculaire ajouté au bouillon. Doser comme témoins des cultures non additionnées de muscle serait illusoire, car les croissances microbiennes et la protéolyse varient dans de grandes proportions d'un tube de culture à l'autre.

De même, l'impossibilité de faire des lambeaux musculaires équivalents nous a interdit l'emploi de la méthode des précipitations par l'acide trichloracétique bouillant. Nous nous sommes donc adressé aux *filtrats* pour juger la question.

II. DANS LES FILTRATS. — *Expériences.* — Nous avons pris les mêmes filtrats que précédemment :

Filtrats normaux ($pH = 7,0$),

Filtrats alcalins ($pH = 8,0$),

Filtrats bouillis, témoins.

Nous les avons additionnés de lambeaux musculaires crus ou dénaturés. Pour dénaturer le muscle, nous avons employé le chauffage au bain-marie à 100 degrés, ou le séjour préalable dans les acides, ou dans la soude décijnormale. Nous avons ajouté du toluène dans tous les tubes pour éviter les contaminations, et nous les avons laissés à l'étuve à 37 degrés pendant 6 jours. Au bout de ce temps, nous avons recherché la présence des peptones, puis titré l'azote au formol dans les liquides de digestion et dans les tubes témoins (filtrats bouillis).

Nous n'avons pu déceler de peptones que dans la digestion du muscle cru par le filtrat d'Histolytique. Quant aux acides aminés, dans aucun cas nous n'avons constaté leur augmentation comparativement aux tubes témoins.

Pour les filtrats d'Histolytique, nous avons remarqué un phénomène singulier qui consiste en la diminution de l'alcalinité et des acides aminés dans les liquides de digestion des filtrats normaux par rapport aux filtrats bouillis.

Nous n'avons donc obtenu avec les lambeaux musculaires

que des digestions médiocres. Nous nous sommes finalement adressé aux *macérations de viande* qui représentent une dissociation extrême de la fibre musculaire. Nous savons que la dissociation augmente considérablement la digestibilité.

Expérience. — Nous avons pris 5 cc. de filtrats de Sporogène (culture de 72 heures) ou d'Histolytique (culture de 24 heures) titrant $pH = 7,0$. Nous avons ajouté à ces filtrats 5 cc. de macération de viande (parties égales de viande hachée de bœuf et d'eau distillée), filtrée sur bougie après séjour de une heure, soit à 37 degrés, soit au bain-marie à 80 degrés. Nous avons dosé immédiatement les acides aminés dans les tubes témoins. Nous avons additionné les autres tubes de toluène et nous les avons laissés à l'étuve à 37 degrés pendant 15 jours. Au bout de ce temps, nous avons titré les acides aminés (méthode de SØRENSEN). Voici nos résultats. Les nombres représentent des centimètres cubes de soude décinormale, et correspondent à 10 cc. de liquide titré.

Digestion des macérations de viande par les filtrats.

Filtrats	Viande chauffée à 37°			Viande chauffée à 80°		
	Azote formol			Azote formol		
	initial	final	augmen- tation	initial	final	augmen- tation
Sporogène . .	1 cc. 9	3 cc. 2	1 cc. 3	2 cc. 0	2 cc. 0	0
Histolytique .	2 cc. 0	3 cc. 3	1 cc. 3	1 cc. 8	2 cc. 4	0 cc. 6

Nous retrouvons là quelques-uns des résultats que nous avait donnés l'observation de la fonte macroscopique du muscle. L'Histolytique attaque les deux macérations, mais beaucoup plus celle chauffée à 37 degrés que celle chauffée à 80 degrés.

Le Sporogène attaque seulement la macération chauffée à 37 degrés.

En résumé, le filtrat d'Histolytique donne des peptones sur le

muscle cru compact, des acides aminés sur le muscle dissocié, cru ou chauffé.

Le filtrat de Sporogène attaque seulement le muscle cru dissocié, en donnant des acides aminés.

D. — POUVOIR KINASANT DES FILTRATS

On sait que certains microbes gélatinolytiques dont les enzymes n'agissent pas sur l'albumine, attaquent au contraire cette dernière en présence d'extrait pancréatique. C'est que dans le pancréas existe non une trypsine, mais un zymogène inactif qui acquiert sa forme active sous l'influence de certains agents comme le suc intestinal, le calcium, etc. Le suc intestinal contient une substance appelée *kinase* qui est capable de transformer le trypsinogène en trypsine.

On peut obtenir le même résultat en ensemençant le suc pancréatique inactif avec des espèces microbiennes déterminées. Certaines bactéries sont donc capables de fabriquer une kinase, qui remplace l'entérokinase. Nous avons recherché si nos filtrats étaient kinasants pour le suc pancréatique de chien.

Nous avons fait agir 3 cc. de nos filtrats sur des lambeaux musculaires de cobaye, en présence de 3 cc. de suc pancréatique inactif. Comme témoins, nous avons pris les filtrats seuls, le suc pancréatique seul, le suc pancréatique activé par 0 cc. 3 de chlorure de calcium à 5 %.

Le filtrat d'*Histolytique*, additionné ou non de suc pancréatique, a solubilisé le muscle cru dans le même temps. Le filtrat de Sporogène n'est pas plus actif après l'addition de suc pancréatique qu'il ne l'était avant.

Il n'existe donc pas de kinase dans nos filtrats.

CONCLUSIONS

(1) *L'Histolytique* possède un ferment myolytique puissant qui solubilise les lambeaux de muscle cru.

Le Sporogène ne digère le muscle cru que si celui-ci est préalablement dissocié.

(2) Les fragments de muscle bouillis résistent à la digestion. Le séjour préalable dans une solution alcaline permet l'attaque par l'*Histolytique* du muscle bouilli ; au contraire, le séjour préalable des lambeaux musculaires dans une solution acide les rend réfractaires à la digestion.

L'état du tissu musculaire le plus favorable à la digestion par les ferments du *Sporogène* et par ceux de l'*Histolytique* est donc l'état dans lequel se trouve le muscle vivant, quand il vient d'être séparé de l'organisme.

(3) La fonte musculaire se produit en milieu neutre.

(4) Les filtrats ne contiennent pas de kinase pour le suc pancréatique.

VI

DIGESTION DE L'ALBUMINE *IN VITRO*

Parallèlement à l'étude de la digestion du muscle, nous avons recherché l'action digestive des deux microbes sur les principales albumines naturelles. Cela nous a permis de comparer ces ferments aux diastases protéolytiques classiques.

PREMIÈRE PARTIE

ALBUMINE DU SÉRUM

Sur le sérum cru ou dénaturé par la chaleur nous avons fait agir les microbes Sporogène et Histolytique. Nous avons ensuite étudié l'action de leurs filtrats sur le sérum cru ou coagulé. Nous n'avons pas fait de distinction entre les diverses albumines que peut contenir le sérum, nos résultats sont par conséquent des résultats globaux.

Pour ne pas employer d'élément pouvant se combiner avec les protéines et dont l'action est de ce fait délicate à doser nous avons utilisé comme méthode de dénaturation la coagulation par la chaleur et non l'action des bases ou des acides.

Nous avons jugé intéressant de faire précéder l'étude de la protéolyse du sérum coagulé d'un aperçu sur la digestion macroscopique des cubes de sérum coagulé.

Notre étude a porté uniquement sur le sérum de cheval conservé stérilement à la glacière.

A. — DIGESTION DU SÉRUM DANS LES CULTURES

I. SÉRUM CRU. — *Expérience.* — Nous avons pris des tubes contenant 10 cc. de bouillon peptone et 10 cc. de sérum cru de cheval. Après addition de traces de sulfure de calcium, nous avons ensemencé ces tubes avec 4 gouttes de cultures de Sporogène ou d'Histolytique, âgées de 24 heures, puis mis à l'étuve à 37 degrés. Nous avons préparé des tubes témoins analogues, que nous avons précipités immédiatement par 10 cc. d'acide trichloracétique bouillant. Les précipités reçus sur des filtres tarés, étaient desséchés à 37 degrés, puis à 105 degrés et enfin pesés. Notons que l'acide trichloracétique ne précipite pas les bouillons de culture (peptones), mais seulement le sérum. Les autres tubes en expérience étaient précipités après 10 jours d'étuve. Les différences de poids des précipités nous indiquaient la quantité de sérum disparue, et par conséquent digérée.

Digestion du sérum cru dans les cultures.

Cultures	Quantité employée	Poids des précipités	Quantité digérée
Sporogène.	1 gr. 105	0 gr. 343	0 gr. 762
Histolytique	1 gr. 105	0 gr. 770	0 gr. 335

Les deux microbes attaquent fortement le sérum cru. Le Sporogène paraît plus actif que l'Histolytique, il fait disparaître en 10 jours les 7/10 du poids initial d'albumine, tandis que l'Histolytique n'en transforme que les 3/10.

II. — SÉRUM DÉNATURÉ

1. — DIGESTION DES CUBES DE SÉRUM COAGULÉ. — Le Sporogène attaque très vite le sérum coagulé préalablement à 100 degrés. Dès le deuxième jour d'étuve le cube est transparent et facilement désagrégué par l'agitation. Après 3-4 jours, la fonte est totale.

Pour l'Histolytique, on constate un début de digestion au troisième jour mais la fonte semble ensuite s'arrêter.

Le sérum coagulé à 100 degrés est plus facilement digéré que le sérum chauffé à 110-120 degrés.

2. — PROTÉOLYSE DU SÉRUM COAGULÉ. — Nous n'avons pas pu employer la méthode des précipitations par l'acide trichloracétique, par suite de la difficulté de faire des tests semblables de sérum coagulé. La méthode de SØERENSEN donne également des résultats erronés, car les acides aminés provenant du bouillon sont confondus dans le titrage avec les acides aminés provenant de la digestion du sérum coagulé.

Nous rapportons néanmoins une de nos expériences, où nous avons utilisé cette dernière méthode. Cette expérience est destinée seulement à comparer la protéolyse des microbes sur le sérum chauffé à 60 degrés et sur le sérum chauffé à 100 degrés.

Expérience. — Nous avons pris 5 cc. de cultures des deux microbes, âgées de 15 heures d'étuve, et nous leur avons ajouté 5 cc. de sérum, coagulé soit 30 minutes à 60 degrés, soit 10 minutes à 100 degrés.

Nous avons déterminé l'azote-formol (SØERENSEN), immédiatement pour les tubes témoins, après 6 jours d'étuve pour les autres tubes. Les nombres donnés ci-dessous, représentent des centimètres cubes de soude décinormale, et correspondent à 5 cc. de culture et 5 cc. de sérum coagulé. A titre de comparaison, également, nous avons rapporté les résultats d'une expérience absolument semblable, mais portant sur 5 cc. de sérum cru.

**Digestions comparées dans les cultures du sérum cru
et du sérum chauffé.**

Cultures	Azote formol total initial			Augmentation de l'azote formol		
	Sérum cru	Sérum chauffé		Sérum cru	Sérum chauffé	
		60°	100°		60°	100°
Sporogène. .	6 cc. 2	6 cc. 4	4 cc. 0	6 cc. 2	15 cc. 9	23 cc. 0
Histolytique .	6 cc. 8	6 cc. 3	4 cc. 0	5 cc. 4	20 cc. 5	25 cc. 7

Ces résultats n'ont aucune valeur absolue, mais ils sont cependant comparables entre eux.

Il est facile de constater que le sérum coagulé à 100 degrés est plus aisément attaqué que le sérum coagulé à 60 degrés, et que celui-ci est mieux digéré que le sérum cru.

B. — DIGESTION DU SÉRUM DANS LES FILTRATS

1. SÉRUM CRU. — Nous avons utilisé des filtrats sur bougie CHAMBERLAND F de cultures à l'air libre de Sporogène (cultures de 72 heures), ou d'Histolytique (24 heures). Pour avoir un ferment plus actif, nous avons précipité ces filtrats par 6 volumes d'alcool à 96 degrés, desséché les précipités, enfin repris par l'eau physiologique les précipités de façon à réaliser une concentration 20 fois plus grande que celle du filtrat initial.

Nous avons ajouté à 3 cc. de ces précipitats 3 cc. de sérum cru, puis nous avons placé les tubes à l'étuve à 37 degrés, après les avoir additionnés d'un centimètre cube de toluène.

Nous avons précipité immédiatement par l'acide trichloracétique bouillant une série de tubes témoins. Nous avons précipité les autres tubes après 4 jours d'étuve. Comme toujours, les précipités étaient jetés sur des filtres tarés, puis pesés.

Digestion du sérum cru par les précipitats.

Précipitats	Quantité employée	Poids des précipités	Quantité digérée
Sporogène.	0 gr. 240	0 gr. 221	0 gr. 049
Histolytique	0 gr. 252	0 gr. 243	0 gr. 009

Comme nous le montre ce tableau, les filtrats n'ont pratiquement aucune action sur le sérum cru. Il n'apparaît pas d'albumoses dans les liquides qui filtrent, ce qui dénote l'absence de digestion.

La concentration en ions H des précipitats était de $pH = 7,0$. Nous n'avons pas mesuré la protéolyse dans d'autres concentrations, car alors ce n'est plus du sérum naturel que l'on a dans les tubes, mais du sérum dénaturé (par les bases ou par les acides) dont les conditions de protéolyse sont très différentes.

II. — DIGESTION PAR LES FILTRATS DU SÉRUM COAGULÉ

1. — DIGESTION MACROSCOPIQUE DES CUBES DE SÉRUM COAGULÉ. — Le Sporogène a une action rapide, dès le premier jour le cube devient transparent sur les bords. La fonte est complète en une semaine environ.

L'Histolytique attaque difficilement le sérum coagulé. Le cube devient friable, mais ne disparaît jamais complètement.

Le calcium favorise l'action du Sporogène. Le sérum chauffé à 90 ou à 100 degrés est plus facilement attaqué que le sérum chauffé préalablement à 120 degrés.

On peut mettre en évidence l'apparition de peptones dans les tubes où l'on remarque une digestion macroscopique.

2. PROTÉOLYSE DU SÉRUM COAGULÉ. — Nous avons pris des filtrats sur bougie CHAMBERLAND F de cultures à l'air libre de Sporogène (72 heures d'étuve) ou d'Histolytique (24 heures). Ces filtrats avaient une concentration $pH = 7,0$ pour le Sporogène, $pH = 6,7$ pour l'Histolytique.

A 2 cc. de ces filtrats nous avons ajouté 3 cc. de sérum chauffé. Comme témoins, nous avons utilisé 2 cc. de filtrats bouillis additionnés de 3 cc. de sérum chauffé. Nous avons fait deux séries d'expériences, avec du sérum chauffé 30 minutes à 60 degrés et avec du sérum chauffé 10 minutes à 100 degrés. Nous avons placé les tubes à l'étuve à 37 degrés après addition de toluène pour éviter les contaminations. Au bout de 6 jours, nous avons dosé les acides aminés dans les tubes par la méthode de SØRENSEN.

Nos résultats ont été négatifs. En effet, constamment, les tubes témoins ont présenté une proportion d'azote titrable au formol plus forte que celle des tubes en expérience. Nous en concluons

que les filtrats ne donnent pas d'acides aminés dans leur attaque du sérum coagulé.

RÉSUMÉ. — Le sérum à l'état cru ou coagulé est attaqué par les deux microbes, qui poussent d'emblée la désintégration jusqu'aux acides aminés.

Les filtrats ne digèrent pas le sérum cru, et donnent seulement des peptones sur le sérum coagulé.

Le Sporogène paraît dans tous les cas plus actif que l'Histolytique.

Les microbes et leurs filtrats attaquent plus facilement le sérum chauffé à 100 degrés que le sérum coagulé à 60 degrés ou que le sérum coagulé à 120 degrés.

DEUXIÈME PARTIE

ALBUMINE D'ŒUF

Nous avons étudié la digestion du blanc d'œuf cru ou coagulé par la chaleur. La dénaturation par les acides ou par les alcalis n'a pas été employée pour ne pas introduire un élément difficile à analyser.

Nous avons recherché l'activité des microbes puis celle des filtrats, successivement sur l'ovalbumine naturelle, et sur l'ovalbumine coagulée. Pour cette dernière, nous avons jugé macroscopiquement la digestion de cubes d'ovalbumine et enfin mesuré la protéolyse avec des méthodes plus précises.

A. — DIGESTION PAR LES MICROBES

I. OVALBUMINE CRUE. — Nous avons haché aux ciseaux un blanc d'œuf frais, nous l'avons additionné d'un égal volume d'eau physiologique stérile, puis nous avons tamisé cette suspension d'ovalbumine sur plusieurs doubles de gaze stérile pour la rendre homogène.

Nous avons pris 2 cc. de cette suspension à 50 0/0 que nous avons introduits dans des tubes de cultures de Sporogène et d'Histolytique pratiquées à l'air libre, sur bouillon de viande putréfiée, et âgées de 4 heures à 37 degrés.

Nous avons précipité immédiatement par l'acide trichloracétique bouillant deux tubes analogues servant de témoins. Nous avons jeté les précipités sur des filtres tarés, desséché, puis pesé les filtres. Nous avons fait la même opération sur les tubes en expérience après un séjour de 4 jours à l'étuve à 37 degrés.

Digestion de l'ovalbumine crue dans les cultures.

Cultures	Quantité employée	Poids des précipités	Quantité digérée
Sporogène	0 gr. 081	0 gr. 072	0 gr. 009
Histolytique	0 gr. 086	0 gr. 077	0 gr. 009

Nous n'avons pas constaté la présence d'albumoses (précipité par refroidissement) dans les liquides qui filtraient. Ces résultats indiquent que les deux microbes attaquent l'ovalbumine crue, mais que cette digestion est très lente puisque au bout de 4 jours ils n'ont digéré, en effet, que 1/10 de la quantité d'ovalbumine employée.

II. OVALBUMINE DÉNATURÉE.

1. *Digestion macroscopique des cubes d'ovalbumine coagulée.* — Nous avons utilisé des cultures à l'air libre sur bouillon de viande putréfiée, en présence de traces de sulfure de calcium.

Au moment de l'ensemencement (avec 4 gouttes de cultures de 24 heures de Sporogène ou d'Histolytique), nous avons additionné les tubes d'un cube de 0 cm. 5 de côté découpé dans de l'ovalbumine coagulée soit 10 minutes à 100 degrés, soit 10 minutes à 115 degrés. Nous avons ensuite mis les tubes à l'étuve à 37 degrés.

Le Sporogène, c'est un de ses meilleurs caractères, se distingue par une digestion rapide et complète. Dès le premier jour, le cube d'albumine est entouré de flocons nuageux, ses angles

s'arrondissent. La fonte est complète en une semaine, et il ne subsiste qu'un dépôt informe et poussiéreux au fond du tube. Le cube demeure toujours opaque.

L'Histolytique, au contraire, rend le cube transparent sur ses faces, mais la fonte est moins importante et rarement complète. La digestion débute au quatrième jour environ pour n'être totale que longtemps après, quinze jours ou plus.

2. — *Protéolyse de l'ovalbumine coagulée.* — Comme dans le cas du sérum coagulé, et pour les mêmes raisons, il nous a été impossible de mesurer exactement la protéolyse de l'ovalbumine coagulée.

A titre de comparaison seulement, nous relatons quelques mesures de protéolyse effectuées au moyen de la titration au formol.

Nous avons pris des tubes contenant 5 cc. d'eau physiologique récemment bouillie, additionnés de traces de sulfure de calcium. Nous avons ajouté à ces tubes 1 cc. de culture d'Histolytique ou de Sporogène puis 3 cc. d'ovalbumine chauffée au bain-marie, soit 30 minutes à 60 degrés, soit 10 minutes à 100 degrés. Nous avons titré les acides aminés immédiatement pour une série de tubes témoins, et après 6 jours d'étuve à 37 degrés pour les autres tubes. A titre de comparaison, également, nous donnons les résultats obtenus avec la même méthode sur l'ovalbumine crue. Les nombres donnés représentent des centimètres cubes de soude décinormale, et correspondent à 10 cc. du liquide titré.

Digestion dans les cultures de l'ovalbumine crue ou coagulée.

Cultures	Azote formol initial			Augmentation de l'azote formol		
	Album. crue	Album. chauffée		Album. crue	Album. chauffée	
		60°	100°		60°	100°
Sporogène.	4 cc. 0	4 cc. 0	4 cc. 0	10 cc. 9	10 cc. 2	13 cc. 1
Histolytique.	5 cc. 4	5 cc. 1	5 cc. 4	9 cc. 5	11 cc. 5	13 cc. 5

B. — DIGESTION PAR LES FILTRATS

I. OVALBUMINE NATURELLE. — *Expérience.* — Nous avons pris des filtrats sur bougie CHAMBERLAND F. de cultures de Sporogène (de 72 heures) ou d'Histolytique (24 heures). A 2 cc. de ces filtrats, d'indice $pH = 7,0$, nous avons ajouté 3 cc. d'ovalbumine crue à 50 0/0, puis quelques gouttes de toluène. Nous avons mis ensuite les tubes à l'étuve à 37 degrés. Nous avons précipité immédiatement par l'acide trichloracétique bouillant une série de tubes témoins, jeté les précipités sur des filtres tarés, desséché puis pesé les précipités. Nous avons fait la même opération sur les tubes en expérience après un séjour de 6 jours à l'étuve.

Digestion de l'ovalbumine crue par les filtrats.

Filtrats	Quantité employée	Poids des précipités	Quantité digérée
Sporogène	0 gr. 210	0 gr. 212	0
Histolytique	0 gr. 490	0 gr. 490	0

Il nous est donc impossible de déceler une digestion quelconque de l'ovalbumine crue par les filtrats.

De même, la méthode de SOERENSEN nous a donné des résultats négatifs. Elle nous a fait constater, en effet, une diminution des acides aminés dans les tubes en expérience, au lieu d'une augmentation qui aurait signifié désintégration protéique, et par conséquent digestion.

Ce résultat paradoxal paraît dû à une précipitation du type colloïdal plutôt qu'à l'action d'une plastéinase dont l'existence dans nos filtrats est problématique.

II. OVALBUMINE DÉNATURÉE.

1. *Digestion macroscopique de cubes d'ovalbumine.* — Nous avons pris des tubes contenant 2 cc. de filtrats de Sporogène ou d'Histolytique

ayant une concentration en ions H⁺ de 6,6 à 7,0. Nous y avons introduit des cubes de 0 cm. 5 de côté, découpés dans de l'ovalbumine coagulée par un chauffage de 10 minutes à 100 degrés ou à 115 degrés. Après addition de toluène, nous avons placé ces tubes à l'étuve à 37 degrés.

L'ovalbumine préalablement coagulée à 115 degrés est assez facilement attaquée par les deux filtrats. Le filtrat d'Histolytique produit la transparence du cube, le filtrat de Sporogène le désagrège au contraire lentement. La digestion devient évidente du 5^e au 10^e jour, mais n'est complète que longtemps après.

L'ovalbumine préalablement coagulée à 100 degrés n'est pas attaquée sensiblement par le filtrat d'Histolytique. Le filtrat de Sporogène produit, au bout d'une semaine, la transparence du cube. En présence de calcium, ce même filtrat désagrège le cube sans le rendre transparent. Le filtrat de Sporogène attaque donc de la même façon l'ovalbumine chauffée à 115 degrés et l'ovalbumine chauffée à 100 degrés, à la condition que cette dernière soit additionnée de calcium. L'état de coagulation optimum permettant la digestion de l'ovalbumine par les filtrats est la coagulation à 115 degrés. Le calcium paraît, dans certaines limites, pouvoir remplacer l'action de la chaleur pour amener cet état de coagulation optimum.

La réaction du biuret est positive chaque fois que l'on observe la digestion macroscopique du cube, elle traduit ainsi la formation de peptones.

2. *Protéolyse de l'ovalbumine dénaturée.* — Nous avons recherché seulement la formation des acides aminés, caractéristiques de la digestion par les microbes étudiés. Cette recherche est restée négative. Il ne paraît pas, par conséquent, que les filtrats poussent la désintégration plus loin que le stade peptone.

Résumé. — Les deux microbes digèrent jusqu'au stade acides aminés l'ovalbumine crue ou coagulée. Les cubes d'ovalbumine

coagulée sont solubilisés par les cultures de Sporogène plus facilement que par les cultures d'Histolytique.

L'ovalbumine chauffée à 115 degrés est mieux digérée que l'ovalbumine coagulée à une température inférieure.

Les filtrats ne digèrent que l'ovalbumine coagulée à 115 degrés. Ils donnent seulement des peptones comme produits de digestion. L'ovalbumine coagulée à des températures inférieures à 115 degrés est difficilement attaquée. Le calcium permet une solubilisation rapide de cette dernière par le filtrat de Sporogène. Pour une température de coagulation inférieure à 100 degrés, il n'y a plus de digestion possible.

TROISIÈME PARTIE

ALBUMINE DU LAIT

Pour être digérée, la micelle d'albumine doit d'abord être coagulée. C'est ainsi que la pepsine n'agit qu'en présence d'acide chlorhydrique, agent qui coagule les albumines ; le suc pancréatique a une action puissante surtout sur les albumines déjà coagulées ; enfin la papaïne a son maximum d'action vers 80 degrés, température de coagulation de la majorité des protéines.

On n'a guère l'occasion d'étudier en même temps la coagulation et la digestion des protéiques sauf dans le cas de la caséine du lait. Les deux ferments, lab et caséase, marchent en effet de pair, et il est facile d'étudier séparément leurs activités qui se succèdent dans le temps.

Pour chacun des microbes étudiés, nous avons déterminé l'apparition, puis mesuré l'action, du double ferment sur le lait cru ou chauffé.

Nous avons utilisé le lait de vache écrémé. Il était malheureusement recueilli sans précautions, et ce défaut d'asepsie nous a empêché de faire sur le lait cru des expériences de longue durée.

A. — ACTION DES CULTURES

I. LAB. — Nous avons effectué des cultures à l'air libre de Sporogène ou d'Histolytique. Nous n'avons placé ces cultures que 5 heures à l'étuve à 37 degrés de manière à avoir des bacilles jeunes, peu autolysés. Ces cultures renfermaient ainsi le minimum de ferment libre et nous permettaient de mesurer seulement l'action propre du microbe. Nous avons additionné ces cultures de lait cru ou de lait chauffé 10 minutes à 105 degrés, en mettant deux parties de lait pour une partie de culture. Nous avons fait deux séries d'expériences, avec ou sans addition au mélange de 0 cc. 3 de chlorure de calcium à 5 0/0. Nous avons placé ensuite les tubes au bain-marie à 37 degrés, en faisant des témoins sans cultures.

Les deux microbes nous ont donné des résultats analogues. Le lait cru est coagulé après 20 heures. Le lait non calcifié donne un caillot compact, tandis que le caillot du lait cru calcifié paraît déjà avoir subi une certaine digestion.

Le lait chauffé à 105 degrés et non calcifié n'est pas coagulé par les cultures. En présence de calcium, il donne très vite (en une demi-heure), un précipité fin et granuleux.

Ces ferments, plus actifs sur le lait cru que sur le lait chauffé présentent donc les caractères des labs d'origine animale.

II. CASÉASE. — Nous n'avons mesuré que l'action de la caséase sur le lait chauffé, le lait cru n'étant pas stérile. A des cultures de 5 heures de Sporogène ou d'Histolytique, nous avons ajouté 2 cc. de lait écrémé, stérilisé 10 minutes à 105 degrés. Nous avons fait deux séries d'expériences avec ou sans chlorure de calcium (0 cc. 3 d'une solution à 5 0/0).

Nous avons précipité immédiatement les tubes témoins par l'acide trichloracétique bouillant, jeté les précipités sur des filtres tarés, desséché et pesé les filtres. Les autres tubes étaient précipités après un séjour de 4 jours à 37 degrés. Rappelons que l'acide trichloracétique ne précipite pas le bouillon que nous avons utilisé.

Caséase des cultures sur le lait chauffé.

Cultures	Quantité de caséine employée		Poids des précipités		Digestions	
		avec calcium		avec calcium		avec calcium
Sporogène	0 gr.080	0 gr.086	0 gr.009	0 gr.067	0 gr.071	0 gr.019
Histolytique . . .	0 gr.080	0 gr.086	0 gr.033	0 gr.070	0 gr.047	0 gr.016

Le Sporogène digère en 4 jours les 8/10 du poids initial de caséine. L'Histolytique, moins actif, n'en digère que les 6/10. La présence de calcium empêche fortement l'action caséolytique. Après addition de calcium, le Sporogène et l'Histolytique ne font plus disparaître que les 2/10 du poids de caséine primitif.

B. — ACTION DES FILTRATS

I. LAB. — Nous avons pris des filtrats sur bougie de cultures de Sporogène (cultures de 72 heures), ou d'Histolytique (cultures de 24 heures). Ces filtrats possédaient une réaction sensiblement neutre ($pH = 7,0$). Nous avons fait agir 1 cc. de ces filtrats sur 3 cc. de lait cru ou sur 3 cc. de lait chauffé 10 minutes à 103 degrés. Nous avons fait deux séries d'expériences avec ou sans addition de 0 cc. 3 de chlorure de calcium à 5 0/0.

Lait	Filtrats	Coagulation du lait après :	
		lait sans calcium	lait avec calcium
cru	Sporogène	1 heure	0 h. 20
	Histolytique	24 heures	0 h. 30
chauffé à 103°	Sporogène	pas de coagulation	0 h. 30
	Histolytique	pas de coagulation	24 heures

Le lab du Sporogène est plus actif que le lab de l'Histolytique.

Sur le lait cru, l'addition de chlorure de calcium accélère la coagulation. Sur le lait chauffé, la coagulation ne se produit qu'en présence de calcium (caractère des labs d'origine animale).

II. CASÉASE. — Nous n'avons mesuré l'action de la caséase que sur le lait chauffé. Le lait cru n'étant pas stérile, n'a pas permis d'effectuer une expérience de longue durée.

Nous avons pris les mêmes filtrats que ceux décrits pour la recherche du ferment-lab. A 1 cc. de ces filtrats, nous avons ajouté 3 cc. de lait chauffé 10 minutes à 105 degrés. Nous avons fait deux séries d'expériences, avec ou sans addition de calcium (0 cc. 3 d'une solution à 5 0/0). Nous avons précipité immédiatement les tubes témoins par l'acide trichloracétique bouillant, jeté les précipités sur des filtres tarés, desséché, puis pesé les filtres. Nous avons placé les autres tubes à 37 degrés, après addition de toluène. Nous avons précipité ces derniers tubes après un séjour de 4 jours à l'étuve.

Caséase des filtrats sur le lait chauffé.

Filtrats	Quantité employée		Poids des précipités		Digestions	
		avec calcium		avec calcium		avec calcium
Sporogène	0 gr. 140	0 gr. 122	0 gr. 050	0 gr. 080	0 gr. 090	0 gr. 042
Histolytique	0 gr. 124	0 gr. 110	0 gr. 058	0 gr. 090	0 gr. 066	0 gr. 020

La caséase du Sporogène se montre légèrement plus active que la caséase de l'Histolytique. En 4 jours, le Sporogène fait disparaître les 6/10 du poids d'albumine primitif, et l'Histolytique les 5/10 seulement.

L'addition de calcium, qui activait les labs, *ralentit* l'action des caséases.

Ainsi, en présence de calcium, le Sporogène ne digère plus que les 3/10, et l'Histolytique que les 1,5/10 du poids initial de caséine.

LE ROLE DU CALCIUM. — Nous savons que le calcium est indispensable pour la coagulation diastasique du lait. Le lait chauffé paraît posséder moins de calcium libre que le lait cru, peut-être à cause de la dissociation des carbonates par la chaleur, et de la formation de sels insolubles de chaux. Si l'on ajoute au lait chauffé une certaine quantité de calcium soluble, la coagulation est de nouveau possible.

On peut expliquer de cette manière l'action du calcium sur le lab. Reste à expliquer l'action du calcium sur la caséase.

Le lait cru, avec ou sans addition de calcium, est coagulé par les filtrats. En présence de calcium, le caillot est constitué par un précipité grenu, spongieux, nageant dans un liquide clair. La digestion a donc accompagné la formation du caséum. Au contraire, sans calcium, le caillot du lait cru est compact, volumineux, et ne se laisse désagréger que lentement. Nous traduirons ce fait en disant que le calcium accélère la caséase sur le lait cru.

L'inverse se produit avec le lait chauffé. En mesurant le poids de caséine transformée par les filtrats au bout de 4 jours, nous avons nettement montré que la digestion du lait chauffé calcifié est beaucoup moins intense que celle du lait chauffé non calcifié. Le calcium *valentit* la caséase sur le lait chauffé.

Le lait chauffé non calcifié est donc digéré par les filtrats sans coagulation apparente préalable. Il est possible que la digestion marche trop rapidement pour laisser apparaître le caillot, ou qu'en d'autres termes, la micelle protéique du caséinogène soit coagulée et digérée en même temps.

STASSANO et TALARICO ont montré que le lait cuit était plus digestible que le lait cru. Nous venons de constater que le calcium accélérât la digestion du lait cru, et retardait la digestion du lait cuit. La digestibilité du lait va donc en croissant du lait cru au lait cru et calcifié, du lait chauffé calcifié au lait chauffé non calcifié. C'est ce dernier état qui constitue l'optimum de digestibilité du lait pour les deux microbes que nous avons étudiés.

VII

INFLUENCE DE LA COAGULATION SUR LA DIGESTION DES ALBUMINES

Nous avons eu l'occasion de rappeler que tout phénomène digestif comprend deux phases : coagulation des micelles puis attaque de ces micelles. Nous avons ensuite constaté qu'on ne rencontre jamais de ferment lytique, c'est-à-dire décondensant l'albumine qui ne soit accompagné d'un agent condensant. La pepsine agit en milieu acide, qui coagule l'albumine ; la pancréatine et la papaïne renferment un lab, précipitant le lait et les albumoses. On n'est d'ailleurs jamais arrivé à séparer ces deux ferments condensant et décondensant.

Le Sporogène et l'Histolytique qui digèrent l'albumine crue, sont sans doute capables de la coaguler. Au contraire, leurs filtrats qui ne possèdent pas toutes les propriétés des cultures, ne s'attaquent à l'albumine que lorsque celle-ci est déjà coagulée.

Il existe, pour chaque albumine, un état de coagulation au-dessous duquel le ferment digestif n'agit pas, et une coagulation optima pour laquelle l'action du ferment digestif est la meilleure possible. Au-dessus de ce taux, enfin, la digestibilité diminue.

Des chapitres qui précèdent, nous pouvons déduire les différentes digestibilités des albumines en fonction de leur état de coagulation par la chaleur.

Remarquons cependant, que pour les albumines organisées en tissu, un élément vient favoriser au plus haut point la diges-

tion, c'est la dissociation du tissu. Cette dissociation permet un contact plus étroit du ferment avec la matière protéique. En multipliant la surface d'attaque elle facilite la digestion. Mais il est bien difficile de mesurer l'intervention de ce facteur dissociation. Et nous nous limiterons aux résultats obtenus sur l'albumine naturelle ou coagulée non dissociée.

Nous avons appris que le *muscle* était mieux digéré cru que chauffé. On sait que la coagulation de la myosine se produit dès que le muscle est séparé de l'organisme. Cet état de coagulation suffit pour permettre la digestion du muscle par les filtrats. Le chauffage provoque une hypercoagulation défavorable.

Le *sérum* est plus facilement attaqué quand il a été chauffé à 100 degrés. Le chauffage préalable à des températures supérieures ou inférieures à 100 degrés diminue sa digestibilité. Le calcium accélère cette digestion

Pour l'*ovalbumine*, sa digestion est facilitée par un chauffage préalable à 115-120 degrés. L'albumine chauffée préalablement à 100 degrés n'est attaquée sensiblement qu'en présence de calcium, qui paraît agir dans le même sens que l'action de la chaleur,

Enfin, le *lait* non chauffé ou chauffé à des températures allant jusqu'à 120 degrés, est digéré par les filtrats de Sporogène ou d'Histolytique. Mais le lait chauffé est moins bien digéré en présence de calcium. On admettait, jusqu'à présent, que, à petites doses, le calcium favorisait les ferments digestifs. Dans le cas du lait chauffé son action est nettement défavorable. Sur le lait cru, au contraire, le caillot donné par les filtrats est mieux digéré en présence de calcium. Tout se passe comme si le calcium provoquait sur le lait chauffé une hypercondensation défavorable, et, amenait par contre le lait cru à l'état optimum de coagulation pour sa digestion.

Peut-être, l'état physique du lait chauffé et calcifié est-il comparable par rapport au lait cru, à l'état du muscle bouilli par rapport au muscle cru.

Pour les albumines du lait et du muscle, l'état naturel

constitue l'état le plus favorable à la digestion par les ferments que nous étudions.

Pour l'albumine du sérum et de l'œuf, il faut une coagulation préalable importante pour que les ferments puissent agir.

L'addition de calcium paraît indiquée dans le cas d'une coagulation faible des micelles (lait cru, muscle cru), et défavorable dans le cas d'une coagulation forte (lait chauffé), car elle agit dans le même sens que l'action de la chaleur pour coaguler les micelles protéiques.

VIII

SITUATION DES ENZYMES DU SPOROGÈNE ET DE L'HISTOLYTIQUE DANS L'ÉCHELLE DES FERMENTS SOLUBLES

Nous nous sommes contenté jusqu'à présent d'étudier les modalités de la digestion des albumines naturelles. Nous avons constaté que les microbes Sporogène et Histolytique attaquaient l'albumine crue et l'albumine dénaturée, que leurs filtrats attaquaient seulement l'albumine amenée à un point optimum de coagulation, optimum qui varie pour chaque albumine. Enfin, nous avons vu que la digestion de l'albumine est poussée d'emblée jusqu'aux acides aminés.

Il est maintenant indispensable de préciser un peu mieux la nature des enzymes du Sporogène et de l'Histolytique, de les comparer, en un mot, aux ferments protéolytiques connus : pepsine, papaïne, trypsine ou érepsine.

Un ferment protéolytique se définit par :

1. La nature du substratum attaqué ;
2. Les produits de digestion ;
3. La concentration optima en ions H du milieu dans lequel il agit.

Pouvons-nous, sur ces bases, reconnaître dans les ferments que nous étudions un enzyme du type *pepsine* ?

Les deux microbes attaquent la matière albuminoïde, et si l'hydrolyse montre peu de peptones, caractère de la digestion pepsique, c'est sans doute qu'elle est poussée au delà et qu'un

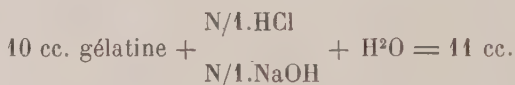
deuxième enzyme scinde ces peptones en polypeptides plus simples.

Mais la réaction du milieu la plus favorable est bien différente dans les deux cas. Pour nos ferments, la protéolyse se produit encore pour un indice du milieu : $pH = 8,0$; pour la pepsine, la concentration optima est de $pH = 1,8$ à $2,0$.

L'expérience suivante enlèvera d'ailleurs tous nos doutes sur ce point.

Nous avons étudié suivant la technique de PALITZCH et WALBUM l'action des filtrats sur la gélatine thymolée, dans des milieux de concentration variable en ions H.

Nous avons d'abord préparé des tubes contenant 10 cc. de gélatine à 7 0/0, thymolée à 0,02 0/0. L'indice pH de cette gélatine, liquéfiée à 37 degrés, était $pH = 4,8$. Nous avons additionné cette gélatine de solutions normales de soude ou d'acide chlorhydrique, de façon à réaliser une échelle de concentrations en ions H de 3,0 à 8,5 (calculées par la méthode colorimétrique). Le volume était complété à 11 cc. avec de l'eau distillée neutre :



A ces tubes de gélatine, nous avons ajouté 0 cc. 5 de filtrats de Sporogène (culture de 72 heures), ou d'Histolytique (culture de 24 heures). Nous les avons placés à l'étuve, et nous les avons examinés après un séjour de 2 heures, de 4 heures, de 20 heures à 37 degrés.

Nous avons refroidi ces tubes dans un bain à 15 degrés puis noté les stades de liquéfaction d'après l'échelle suivante :

0. solide ;
1. se fragmente par l'agitation ;
2. tremblotante ;
3. molle ;
4. demi-fluide ;
5. presque liquide ;
6. liquide.

Nous avons calculé par la méthode colorimétrique les concentrations en ions H des tubes après le séjour à l'étuve.

Résultats

pH initial	pH final	
	Sporogène	Histolytique
3,0	3,0	3,0
4,0	4,0	4,0
4,8	4,6	4,8
5,5	5,5	5,5
6,8	6,3	6,3
7,0	6,8	6,7
8,3	7,8	7,3

Les concentrations ont donc peu varié. Nous avons tracé des courbes en portant les valeurs finales des concentrations en

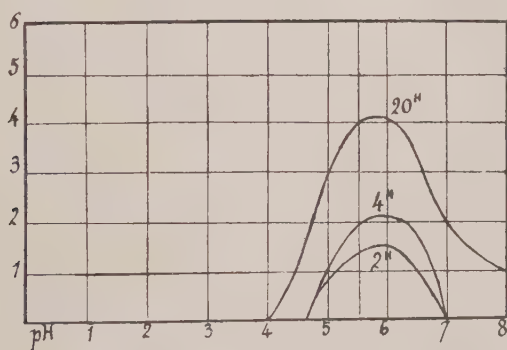


Fig. 11. — Gélatinase du filtrat de Sporogène.

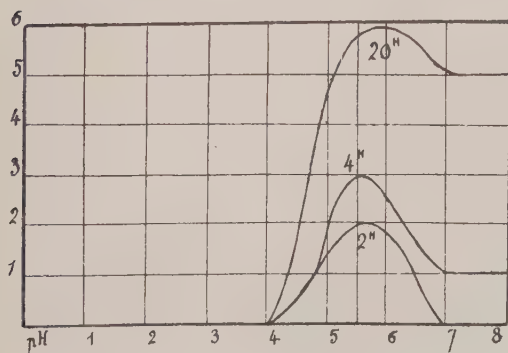


Fig. 12. — Gélatinase du filtrat d'Histolytique.

ions H en abscisses, tandis qu'en ordonnées nous inscrivions les degrés de liquéfaction de la gélatine.

L'examen de ces courbes montre que les gélatinases des deux microbes ont un optimum d'activité pour $pH = 5,5$ à $6,0$.

Cet optimum est bien différent de celui de la pepsine. PALITZCH et WALBUM ont en effet trouvé que la pepsine liquéfiait la gélatine thymolée avec un indice pH optimum de $1,8$. Les ferments du Sporogène et de l'Histolytique ne contiennent donc pas de ferment analogue à la pepsine.

Nous pouvons encore comparer ces ferments aux enzymes du groupe des *papaïnes* (papaïne, broméline, latex du figuier, etc.).

Comme la papaïne, nos deux microbes digèrent l'albumine crue sans nécessiter de dénaturation artificielle préalable. La protéolyse s'effectue dans les deux cas indifféremment en milieu neutre ou légèrement alcalin. Les principaux caractères de la papaïne sont :

1. résistance à la chaleur ;
2. digestion brusque à haute température ;
3. pouvoir précipitant des peptones.

Or, sur tous ces points, quoique nous ayons patiemment renouvelé nos essais, nos résultats sont restés négatifs.

Tout d'abord, les ferments du Sporogène et de l'Histolytique ne résistent pas à un chauffage de 10 minutes à 80 degrés, alors que la papaïne supporte sans dommage cette température pendant 30 minutes. Ce fait explique que nous ne retrouvions pas le phénomène si particulier de la digestion brusque à haute température. Nous avons recherché ce dernier phénomène sur la gélatine, sur l'ovalbumine crue et sur le sérum cru.

Nous n'avons pas constaté de gélatinase à haute température. En chauffant au bain-marie bouillant pendant 5 minutes un tube contenant 2 cc. de gélatine à 10 0/0 et 0. cc. 5. de filtrat de Sporogène ou d'Histolytique, nous n'avons pu déceler la moin-

dre digestion (persistance de l'état liquide) par rapport aux tubes témoins.

De même, il nous a été impossible de mettre en évidence une digestion brusque du sérum cru ou de l'ovalbumine crue.

Expérience. — Nous avons fait agir 3 cc. de filtrats sur 3 cc. d'une suspension d'ovalbumine à 50 0,0 dans l'eau physiologique. La concentration en ions H des filtrats était $pH = 7,0$.

Nous avons fait une série de tubes témoins avec 3 cc. d'ovalbumine et 3 cc. de filtrats chauffés 10 minutes au bain-marie à 100 degrés. Nous avons amené lentement les tubes normaux et les tubes témoins à l'ébullition sur un bec BUNSEN. Aussitôt après, nous avons précipité les tubes par l'acide trichloracétique bouillant, desséché, enfin pesé les précipités.

Digestion de l'ovalbumine à haute température.

Filtrats	Quantité employée	Poids des précipités	Digestions
Sporogène	0 gr. 210	0 gr. 498	0 gr. 012
Histolytique	0 gr. 490	0 gr. 181	0 gr. 009

La digestion est insignifiante. De plus la recherche des albumoses dans les liquides qui filtraient a toujours été négative.

Nous avons répété la même expérience, en substituant à 3 cc. d'ovalbumine, 3 cc. de sérum de cheval. Les résultats sont analogues à ceux de l'expérience précédente.

Digestion du sérum à haute température.

Filtrats	Quantité employée	Poids des précipités	Digestions
Sporogène.	0 gr. 273	0 gr. 259	0 gr. 014
Histolytique	0 gr. 240	0 gr. 219	0 gr. 021

Nous ne retrouvons pas la propriété si caractéristique des papaines, qui à 80 degrés digèrent instantanément le sérum ou l'ovalbumine crus.

Reste enfin le troisième caractère des papaines : pouvoir précipitant des peptones par les solutions papainiques bouillies.

Nous avons déjà signalé dans les pages qui précèdent que les filtrats bouillis employés comme témoins dans les mesures de protéolyse donnaient à la longue des précipités opalescents au contact des albumines naturelles. Pour la papaine ce précipité apparaît immédiatement, surtout dans un milieu légèrement alcalin. Nous n'avons pu retrouver ce phénomène que pour les filtrats d'Histolitique et encore à l'état d'ébauche.

Nous avons fait macérer une heure à 37 degrés dans un litre d'eau un kilo de viande de bœuf hachée. Nous avons neutralisé la macération à la phtaléine ($pH = 8,0$) et nous l'avons filtrée sur bougie de porcelaine, pour ne conserver que les peptones et les albumoses. Nous avons alors ajouté à 1 cc. de liquide clair 1 cc. de filtrat normal de Sporogène ou d'Histolitique. Nous avons effectué la même opération en employant des filtrats chauffés une minute à l'ébullition, puis filtrés sur papier. Comme témoin, nous avons pris 1 cc. de solution de papaine ou 1 cc. de solution de papaine bouillie puis filtrée sur papier Chardin, que nous avons mis au contact de 1 cc. de macération.

Résultats

Solutions		Action sur la macération de viande
Papaine	{ normale.	pas de précipité précipité abondant
	{ bouillie	
Filtrat de Sporogène	{ normal	pas de précipité pas de précipité
	{ bouilli	
Filtrat d'Histolitique	{ normal	pas de précipité trouble augmentant par le séjour à 37°
	{ bouilli	

Il est nécessaire de filtrer les solutions bouillies car l'ébullition trouble abondamment les solutions de papaine et rend très opalescents les filtrats de Sporogène et d'Histolitique.

Sur la macération de viande, la papaïne bouillie produit un précipité très net, le filtrat de Sporogène est inactif, le filtrat d'Histolytique donne seulement un louche qui augmente par le séjour à 37 degrés.

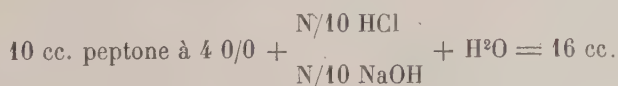
Nous ne pouvons baser sur ce caractère fragile une assimilation des deux groupes de ferments. Il est vraisemblable que ce pouvoir précipitant relève d'un phénomène plus général.

Les ferments du Sporogène et de l'Histolytique qui n'agissent ni comme une pepsine, ni comme une papaïne, sont à rapprocher des *peptases* de VINES, ferments protéolytiques qui apparaissent dans les graines en germination et dans l'autolyse de la levure. Comme les filtrats du Sporogène et de l'Histolytique, ces diastases hydrolysent l'albumine, sont actives en milieu neutre ou plutôt en milieu légèrement acide, et conduisent la matière protéique aux stades albumoses et peptones.

Mais nous avons signalé la grande proportion d'acides aminés apparaissant dans les cultures sur bouillon et même pendant la digestion des albumines naturelles. On ne peut rapporter ce fait à une peptase dont l'action sur les protéines dépasse rarement les peptones comme produits de transformation. Il faut admettre l'existence d'un autre ferment qui disloque les peptones en acides aminés.

Pour résoudre ce problème, nous avons recherché la concentration optima en ions H qui permettait aux ferments du Sporogène et de l'Histolytique de transformer les peptones en acides aminés.

Nous avons d'abord préparé des solutions de peptone possédant des concentrations variables en ions H. Pour cela nous avons additionné 10 cc. de peptone de WITTE à 4 0/0, titrant $pH = 4,5$, de solutions décimales de soude ou d'acide chlorhydrique de façon à réaliser une gamme de concentrations de 3,0 à 8,5, calculées par la méthode colorimétrique. Par l'addition d'eau distillée neutre, nous avons réalisé constamment un volume total de 16 cc.



Nos des tubes	cc. N/10 NaOH	cc. N/10 HCl	pH calculé
1	—	6,0	3,0
2	—	4,0	4,0
3	—	—	4,5
4	0,4	—	5,5
5	0,8	—	6,2
6	2,0	—	7,1
7	3,0	—	7,6
8	5,0	—	8,5

Nous avons ajouté à chaque tube 1 cc. de filtrat de Sporogène (culture de 72 heures), ou d'Histolytique (culture de 24 heures), titrant $pH = 7,0$, c'est-à-dire de réaction neutre.

Nous avons mis dans chaque tube quelques gouttes de toluène comme antiseptique. Nous avons titré l'azote-formol immédiatement pour une série de tubes témoins, après un séjour de 17 heures à 37 degrés pour les autres tubes. Nous avons également calculé les variations de pH dans une série de tubes de contrôle.

Voici nos résultats, donnés en centimètres cubes de soude décinormale et correspondant à 10 cc. de peptone.

pH initial	pH final		Augmentation des acides aminés	
	Sporogène	Histolytique	Sporogène	Histolytique
3,3	3,3	3,3	0	0
4,1	4,1	4,1	0,2	0,2
4,6	4,7	4,8	0,8	0,5
5,5	5,8	5,8	1,0	1,4
6,2	6,5	6,5	1,4	1,4
7,1	7,4	7,2	1,3	0,8
7,6	7,6	7,6	0,6	0,2
8,5	8,5	8,5	0	0

Ces résultats sont plus faciles à interpréter sur un graphique. Nous avons porté en abscisses les valeurs finales des pH , en ordonnées l'augmentation des acides aminés (en centimètres cubes de soude décinormale).

L'optimum de concentration en ions H pour la scission des peptones est analogue pour les ferments des deux microbes, et

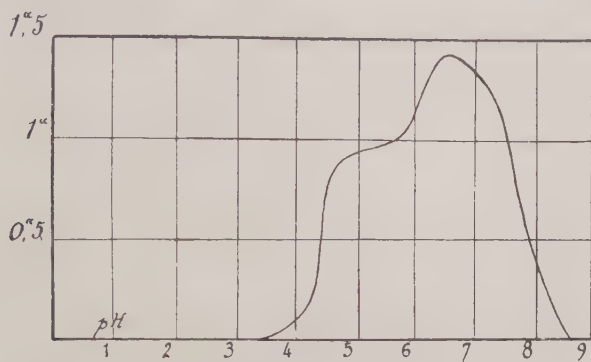


Fig. 13. — Action du filtrat de sporogène sur la peptone.

se place au voisinage de $pH = 6,0$. C'est le résultat que nous

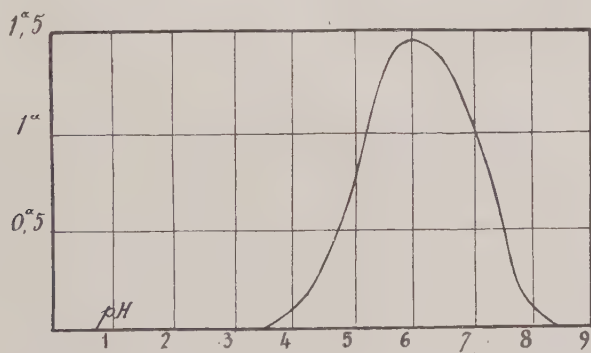


Fig. 14. — Action du filtrat d'histolytique sur la peptone.

avait déjà donné la recherche de l'optimum de concentration pour la gélatinase des filtrats.

Deux enzymes sont aptes à scinder les peptones en acides aminés : la *trypsine* et l'*érepsine*. Leur distinction est malaisée. Ces diastases s'attaquent toutes deux à des substances très voisines, et donnent des produits dérivés semblables. Les milieux dans lesquels elles agissent ont des concentrations optima en ions H analogues, $pH = 7,8$.

Le seul moyen de les différencier est d'essayer leur activité sur un dipeptide simple, comme la glycylglycine, sur lequel la trypsine n'agit pas mais qui est dédoublé par l'érepsine.

Nous n'avons pas fait cette étude, délicate par la difficulté de se procurer cette substance à l'état de pureté, difficile du fait que l'on doit d'abord rechercher le mode de dédoublement du dipeptide et les variations de concentration ionique pendant cette réaction.

La précipitation par la safranine à 8 0/00, réaction qui, d'après ROBERTSON, est caractéristique des trypsines, s'est montrée positive pour les filtrats des deux microbes.

D'un autre côté, ces ferments microbiens libèrent, dans leur attaque de la matière protéique, une grande quantité d'acides aminés. Cette augmentation rapide de l'azote titrable au formol est caractéristique de l'érepsine qui met en liberté les chaînes peptidiques simples, au contraire de la trypsine qui ne donne qu'à la longue des noyaux aminés simples.

Nous ne distinguerons pas entre les actions de la trypsine et de l'érepsine qui peuvent exister dans les ferments du Sporogène et de l'Histolytique. Nous dirons que ces ferments contiennent des enzymes appartenant au type trypsine-érepsine. Ils sont analogues aux ferments animaux, trypsine du pancréas, érepsine intestinale, à cela près que les concentrations optima des milieux dans lesquels ils agissent sont différentes : $pH = 6,0$ pour les filtrats des deux microbes, $pH = 8,0$ pour les ferments animaux.

Enfin, il doit exister dans les filtrats un quatrième enzyme qui disloque le noyau peptide, puisqu'il apparaît pendant la protéolyse une certaine quantité d'ammoniaque libre. On donne le nom d'*amidase* aux enzymes qui produisent de l'ammoniaque aux dépens des acides aminés. Dans les cultures des deux microbes Sporogène et Histolytique leur existence est facilement décelée.

Expérience. — Nous avonsensemencé des tubes contenant 10 cc. de peptone à 4,4 0/0, récemment bouillie et additionnée de traces de sul-

fure de calcium, avec quatre gouttes de cultures de 24 heures de Sporogène ou d'Histolytique. Nous avons placé ces tubes à 37 degrés.

Sur 2 cc. 5 de liquide nous avons dosé toutes les 24 heures l'azote formol par la méthode de SØRENSEN, et l'ammoniaque par la distillation en présence de magnésie légère, suivie du titrage des acides aminés. La différence entre l'azote formol initial et les acides aminés du

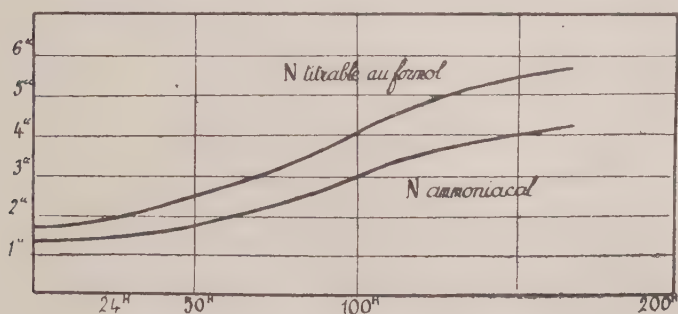


Fig. 15. — Amidase des cultures du Sporogène.

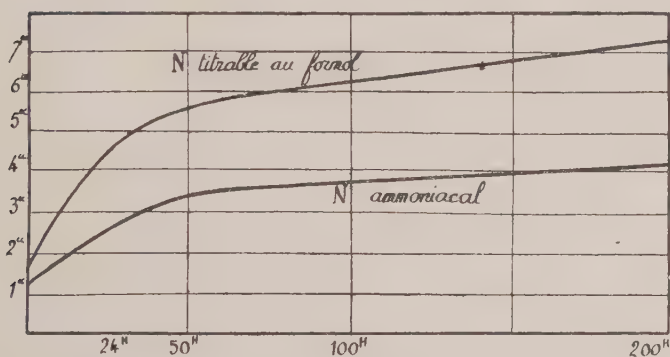


Fig. 16. — Amidase des cultures de l'Histolytique.

deuxième dosage nous donnait la quantité d'ammoniaque disparue pendant la distillation, et par conséquent contenue dans le milieu (On sait que la méthode de SØRENSEN titre en même temps les acides aminés et l'ammoniaque).

Nous avons établi des courbes en portant sur la ligne des abscisses les heures de séjour à l'étuve, et sur la ligne des ordonnées les valeurs de l'azote formol total ou de l'ammoniaque, exprimées en centimètres cubes de soude décijnormale et correspondant à 2 cc. 5 de liquide.

Après 10 jours d'étuve, les quantités d'ammoniaque sont 6 à 10 fois supérieures aux taux initiaux. L'amidase du Sporogène paraît plus active que l'amidase de l'Histolytique. Le rapport entre les quantités d'azote aminé total et d'ammoniaque est à peu près constant. Il vaut environ 1,7 à 2.

Nous avons essayé de retrouver cette amidase en cultivant les microbes sur des acides monoaminés. Nous avons utilisé un

milieu $\left\{ \begin{array}{l} \text{glycocolle 5 0/0} \\ \text{asparagine 4,4 0/0,} \end{array} \right.$, que nous avons neutralisé, puis

filtré. Mais dans ce milieu pauvre, les cultures ne se sont pas développées normalement. Nous n'avons pas été plus heureux en faisant agir les filtrats sur le même milieu asparagine-glycocolle, et il nous a été impossible de déceler la présence d'une amidase dans les filtrats. Il est vrai que de nombreux auteurs (PRINGSHEIM, ABDERHALDEN et SCHITTENHELM, DERNBY), en opérant sur l'amidase de la levure, ont signalé la difficulté de mettre ce ferment en évidence dans les liquides d'autolyse des levures.

En résumé, nous avons démontré que le Sporogène et l'Histolytique possédaient quatre diastases protéolytiques :

- Une *protéase*, qui attaque l'albumine et donne des peptones ;
- Une *trypsine* et une *érepsine*, qui forment des acides aminés ;
- Une *amidase* enfin, qui libère l'ammoniaque et les amines.

Ce sont là les enzymes de l'*hydrolyse*. Mais il existe également des diastases de *synthèse*, que DANILEWSKY a dénommées *plastéinases*, et qui reconstruisent une albumine complexe avec ses produits de dégradation. On met en évidence ces diastases par le précipité qu'elles donnent sur des solutions concentrées d'acides aminés.

Nous avons recherché la présence d'une plastéinase dans les filtrats des deux microbes Sporogène et Histolytique. Nous avons fait agir les filtrats sur des solutions à 40 0/0 de peptone DEFRESNE (riche en acides aminés), neutralisée. Nous avons dosé immédiatement l'azote formol dans les tubes témoins. Nous avons dosé l'azote formol dans les autres tubes après un séjour de 9 jours à 37 degrés.

Nos essais pour déceler une plastéinase sont restés infructueux ; nous n'avons pas obtenu de précipité dans les tubes, de plus les acides aminés ont légèrement augmenté dans les tubes en expérience (hydrolyse, au lieu de condensation qui aurait indiqué la présence d'une diastase de synthèse).

IX

LOI D'ACTION DES FERMENTS

Nous avons essayé de déterminer la loi d'action des ferments du Sporogène et de l'Histolytique.

En mesurant l'activité de nos filtrats sur la gélatine, nous avons pu constater que le temps nécessaire à la liquéfaction des tests de gélatine était inversement proportionnel à la quantité de filtrat entrant en jeu.

Nous rapportons ici les résultats de nos recherches pour établir la loi d'action des caséases avec les filtrats du Sporogène.

Nous avons utilisé différents filtrats variant entre eux par le mode d'obtention : filtration simple sur bougie, ou filtration suivie de précipitation par l'alcool. Nous avons fait agir des quantités variables de ces filtrats que nous appellerons C et D, sur 3 cc. de lait chauffé 10 minutes à 405 degrés (Bien entendu, ces filtrats possédaient la même réaction $pH = 7,0$). Nous avons fait deux séries d'expériences avec ou sans addition de calcium. Nous avons précipité immédiatement les tubes témoins par l'acide trichloracétique bouillant. Nous avons jeté les précipités sur des filtres tarés, desséché, puis pesé les précipités. Nous avons précipité les autres tubes après un séjour de 4 jours à l'étuve à 37 degrés. Voici nos résultats.

(Pour donner plus de clarté au tableau ci-après, nous avons réduit à 2 cc. la quantité de lait employée dans les expériences en milieu additionné de calcium).

Caséase du Sporogène.

Filtrats	Quantité employée		Poids des précipités		Quantité digérée	
		avec calcium		avec calcium		avec calcium
C	0 cc. 1	0 gr. 218	0 gr. 141	0 gr. 072	0 gr. 108	0 gr. 146
	0 cc. 3	0 gr. 218	0 gr. 141	0 gr. 058	0 gr. 084	0 gr. 160
	0 cc. 5	0 gr. 218	0 gr. 141	0 gr. 049	0 gr. 083	0 gr. 169
D	0 cc. 1	0 gr. 218	0 gr. 141	0 gr. 119	0 gr. 131	0 gr. 099
	0 cc. 3	0 gr. 218	0 gr. 141	0 gr. 121	0 gr. 115	0 gr. 097
	0 cc. 5	0 gr. 218	0 gr. 141	0 gr. 102	0 gr. 113	0 gr. 116

Ces résultats sont plus clairs sur le graphique ci-dessous.

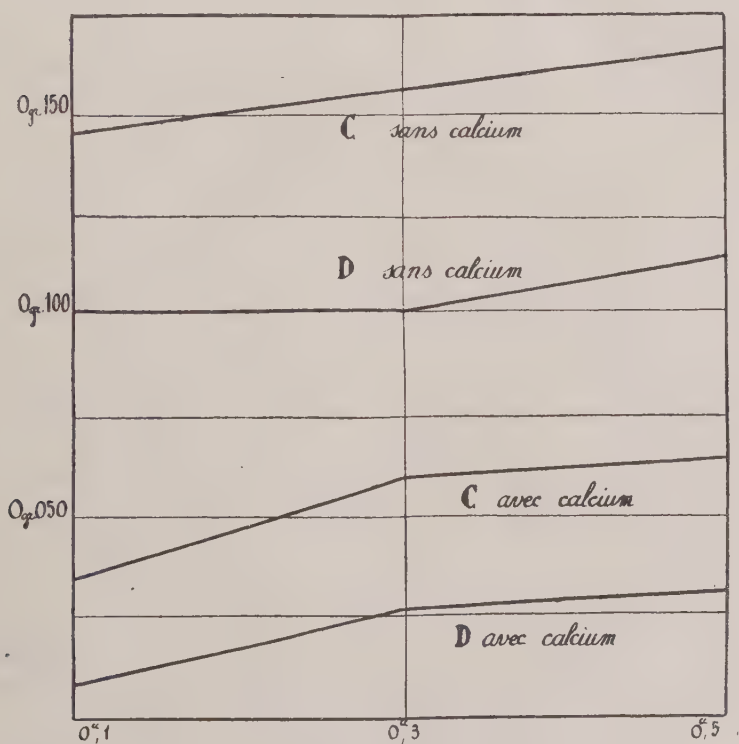


Fig. 17. — Caséase des filtrats de Sporogène.

En abscisses, nous avons porté les volumes V^1 , V^2 , V^3 de filtrat, en ordonnées les poids P^1 , P^2 , P^3 de caséine digérée (en milligrammes).

Nous obtenons ainsi des lignes brisées se rapprochant sensiblement d'une ligne droite. La formule de cette droite peut s'écrire :

$$\frac{P^2 - P^1}{V^2 - V^1} = \text{constante.}$$

Le poids de matière digérée varie proportionnellement à la quantité de ferment. Rappelons que la loi d'action des diastases de SCHUTZ-BORISSOW est différente : la quantité de matière transformée varierait proportionnellement à la racine carrée de la quantité de ferment.

X

ÉTUDE DU POUVOIR EMPÊCHANT DES SÉRUMS NORMAUX OU SPÉCIFIQUES SUR LES FERMENTS DU SPOROGÈNE ET DE L'HISTOLYTIQUE.

I. — ACTION DU SÉRUM NORMAL

A l'état naturel, l'albumine est difficilement attaquée par les ferments protéolytiques, et sa présence entrave l'action de ces ferments sur l'albumine coagulée. On traduit ce fait en disant que l'albumine naturelle renferme un anti ferment.

Le sérum, l'ovalbumine, la gélatine même, jouissent de cette propriété. Le sérum, par exemple, contient une antipepsine, une antitrypsine, une antipapaine. Les protéases microbiennes sont également sensibles à cette action empêchante.

Nous avons recherché l'action du sérum normal sur les filtrats du Sporogène et de l'Histolytique. Nous avons étudié cette action sur la gélatinase des filtrats, sur leur caséase, enfin sur leur trypsine.

1. ACTION SUR LA GÉLATINASE. — Par une expérience préliminaire, nous avons déterminé la dose de filtrat qui digérait 2 cc. de gélatine à 10 0/0 en 30 minutes à 37 degrés. Ces doses étaient, respectivement, 0 cc. 2 pour l'Histolytique, et 1 cc. pour le Sporogène.

Nous avons préparé des tubes contenant 2 cc. de gélatine et ces doses types de filtrats. Nous leur avons ajouté des doses variables de sérum de cheval conservé à la glacière, et nous avons ramené tous les tubes à un volume constant avec de l'eau physiologique neutre.

Nous avons examiné les tubes après un séjour de 30 minutes à 37 degrés.

Résultats. — La gélatinase du Sporogène est déjà empêchée par 0 cc. 02 de sérum (digestion retardée), elle est complètement inhibée par 0 cc. 05 (aucun indice de digestion):

Au contraire, sur la gélatinase de l'Histolytique, les doses faibles, 0 cc. 01, comme les doses très fortes : 2 cc. de sérum, se sont montrées sans action.

Nous avons essayé de favoriser l'action du sérum sur le ferment de l'Histolytique par un contact préalable plus ou moins prolongé du sérum et du filtrat.

Nous avons répété l'expérience ci-dessus, en prenant 0 cc. 2 de filtrat d'Histolytique et 0 cc. 1 de sérum normal, comme doses invariables. Nous avons laissé filtrat et sérum en contact 5 minutes, 15 minutes, 30 minutes, 1 heure, avant de faire agir le mélange sur la gélatine.

		Temps nécessaire à la digestion	
Témoins {		Coagulation en 2 min. à 42 degrés.	
{		Digestion totale après 30 minutes.	
Mélanges filtrat-sérum à 48 degrés, après un contact de	gélatine seule	—	30 —
	gélatine et filtrat.	—	1 heure.
	immédiatement	—	1 —
	5 minutes	—	1 —
	15 —	—	1 —
	30 —	—	1 —
	1 heure	—	1 —

Il y a donc un retard de la gélatinase pour les mélanges de sérum et de filtrat pratiqués 5 minutes avant l'addition à la gélatine. Un contact prolongé n'est pas plus favorable. L'arrêt n'est d'ailleurs pas absolu, la digestion s'effectue quand même.

2. ACTION SUR LE LAB ET SUR LA CASÉASE. — Nous avons fait agir 0 cc. 2 de filtrat d'Histolytique ou 1 cc. de filtrat de Sporogène (mêmes doses que pour l'étude des gélatinases) sur 3 cc. de lait chauffé 10 minutes à 405 degrés, additionné de 0 cc. 3 de chlorure de calcium. Nous avons fait deux séries d'expériences avec ou sans addition de sérum normal.

Nous avons précipité immédiatement par l'acide trichloracétique bouillant les tubes témoins, jeté les précipités sur des filtres tarés, desséché et pesé les précipités. Nous avons fait la même opération sur les autres tubes après les avoir laissés 4 jours à l'étuve à 37 degrés.

Action sur le lab. — Les labs qui coagulent normalement le lait chauffé calcifié sont totalement empêchés par le sérum normal.

Action sur la caséase. — Les caséases sont presque complètement inhibées par le sérum normal. Tandis que la digestion dans les tubes témoins, sans sérum normal, atteint les $\frac{3}{10}$ du poids initial de caséine pour l'Histolytique, les $\frac{4}{10}$ pour le Sporogène, l'addition de sérum fait tomber ces proportions à $\frac{1}{100}$ pour l'Histolytique, et à $\frac{3}{100}$ pour le Sporogène.

3. ACTION SUR LA TRYPSINE DES FILTRATS. — Dans les tubes contenant 3 cc. de filtrat d'Histolytique ou de Sporogène, nous avons placé des cubes d'ovalbumine coagulée par une température de 115 degrés. Nous avons fait une série de témoins. A une deuxième série, nous avons ajouté 0 cc. 1 de sérum normal de cheval. Après addition de toluène dans les tubes, nous les avons placés à l'étuve à 37 degrés.

Pour les deux filtrats, nous avons obtenu un résultat analogue. Au bout de 6 à 8 jours, le cube d'ovalbumine devient translucide et friable dans les tubes témoins. Dans les tubes additionnés de sérum, le cube reste intact.

Les filtrats de Sporogène et de l'Histolytique n'échappent donc pas à l'action empêchante du sérum sur les ferments solubles. La gélatinase de l'Histolytique paraît seule faire exception. Mais nous savons que, d'une façon générale, si l'on emploie des doses suffisantes de ferment, le sérum normal n'a plus guère d'action empêchante. La gélatinase de l'Histolytique est excessivement puissante. Même à dose très faible (0 cc. 2) elle digère rapidement la gélatine. Vis-à-vis de cette dose le sérum n'a déjà plus d'action. Son pouvoir empêchant existe cependant toujours, puisque un contact préalable avec le sérum abaisse sensiblement l'action liquéfiante du filtrat d'Histolytique. Remarquons, en passant, que cette indépendance de la protéase de l'Histolytique envers le pouvoir empêchant du sérum normal pourrait expliquer dans une certaine mesure l'action digestive de ce microbe sur les tissus animaux.

II. — ACTION DES SÉRUMS SPÉCIFIQUES

On peut schématiquement se représenter une diastase comme un complexe composé d'un noyau albuminoïde inactif sur lequel sont greffées des particules non protéiques, probablement des ions, qui constituent seuls la partie active du ferment. Cette partie active est commune à toutes les diastases d'un même groupe. Le noyau protéique est, au contraire, spécifique et appartient en propre à la cellule qui sécrète l'enzyme. Il est également *antigène*, c'est-à-dire que son introduction dans un organisme quelconque provoque une réaction de cet organisme, dirigée spécialement contre l'élément envahisseur. Cette réaction se traduit par la production de substances spécifiques appelées *anticorps*.

On possède ainsi le moyen de différencier deux diastases appartenant à la même classe, mais sécrétées par des organismes différents. Si ces organismes sont parents, les parties antigènes spécifiques des diastases seront semblables, et leurs anticorps également. On constatera le contraire pour des diastases issues de deux organismes n'ayant aucune parenté. Avec les antiferments on peut ainsi reconnaître les enzymes spécifiques.

Nous avons utilisé les sérums antitoxiques obtenus par M. WEINBERG en injectant des chevaux avec des cultures filtrées de Sporogène ou d'Histolytique. Avec ces sérums, préparés dans un but thérapeutique, nous avons répété les mêmes expériences que nous avons réalisées avec le sérum normal de cheval. Nous avons déjà décrit les détails de ces expériences dans les pages qui précèdent.

1. ACTION SUR LES GÉLATINASES. — Nous avons employé 0 cc. 2 de filtrat d'Histolytique et 1 cc. de filtrat de Sporogène, doses qui liquéfiaient le test de gélatine en 30 minutes à 37 degrés.

Nous avons recherché pour chacun des filtrats les doses

empêchantes du sérum spécifique correspondant et du sérum spécifique étranger (action croisée).

Le sérum anti-Histolytique ralentit l'action de la gélatine de l'Histolytique à la dose de 0 cc. 0005, il l'empêche totalement à la dose de 0 cc. 002. Sur la gélatinase du Sporogène, il agit comme le fait un sérum normal : le ferment est empêché par 0 cc. 02 de sérum, et arrêté complètement par 0 cc. 05.

Le sérum anti-Sporogène ralentit l'action de la gélatinase du Sporogène à la dose de 0 cc. 002, il arrête cette action à la dose de 0 cc. 005.

Sur la gélatinase de l'Histolytique il se conduit comme un sérum normal, aucune dose (même 2 cc.) n'est empêchante.

2. ACTION DES SÉRUMS SPÉCIFIQUES SUR LES LABS ET SUR LES CASÉASES.

— Comme nous l'avons fait pour le sérum normal, nous avons recherché le pouvoir empêchant des sérums spécifiques sur les labs et sur les caséases des filtrats. Ces expériences sont absolument semblables à cela près que nous avons substitué au sérum normal le sérum anti-Histolytique ou le sérum anti-Sporogène.

Action sur les labs. — Nous avons utilisé 0 cc. 01 de sérum anti-Histolytique ou de sérum anti-Sporogène. Les labs sont complètement empêchés par les sérums spécifiques correspondants.

Action sur les caséases. — Les poids de caséine digérée diminuent sensiblement quand on additionne les filtrats des sérums spécifiques correspondants. Une dose de 0 cc. 01 de sérum anti-Sporogène ou de sérum anti-Histolytique diminue de $\frac{1}{3}$ environ l'activité de la caséase correspondante (activité mesurée par les poids de caséine digérée). Des doses plus élevées sont complètement empêchantes. Nous n'avons pas mesuré l'action croisée des sérums spécifiques sur les caséases.

3. ACTION SUR LA TRYPSINE DES FILTRATS.

— De même que le sérum normal, les sérums spécifiques empêchent la digestion de l'ovalbumine coagulée (perte de l'opacité, friabilité du cube).

Ils agissent seulement à dose beaucoup plus faible. Nous avons constaté que la dose de 0 cc. 01 suffisait pour entraver la digestion. Les sérums anti-protéasiques se comportent comme le sérum normal quand on les fait agir sur le filtrat du microbe étranger (action croisée).

Ces deux sérums anti-protéasiques sont par conséquent étroitement spécifiques. Ils nous démontrent qu'il n'existe aucune parenté de race entre les deux microbes Sporogène et Histolytique.

XI

CONCLUSIONS

1. Nous avons établi que les lambeaux de muscle cru sont digérés *in vivo* et *in vitro* par le B. Histolytique (cultures et filtrats), et qu'au contraire, le B. Sporogène n'attaque qu'un muscle déjà dénaturé.

2. Sur les autres albumines, les deux microbes se conduisent de façon analogue. En effet, leurs cultures donnent des acides aminés en agissant sur l'albumine naturelle ou dénaturée; leurs filtrats attaquent seulement l'albumine préalablement coagulée, et n'aboutissent qu'au stade peptone (Mis d'emblée en présence de peptones, les filtrats donnent des acides aminés).

3. Il existe, pour chaque albumine, un état optimum de coagulation (par la chaleur), qui favorise sa digestion par les ferments des deux microbes étudiés, tandis qu'une coagulation plus faible ou plus forte diminue sa digestibilité. L'addition de sels solubles de calcium agit dans le même sens que la chaleur, elle est favorable dans le cas d'une albumine peu coagulée, et défavorable dans le cas d'une albumine ayant atteint ou dépassé l'état optimum de coagulation.

4. Le Sporogène et l'Histolytique n'élaborent pas de ferment analogue à la pepsine ou à la papaïne. Dans leurs cultures, nous avons démontré l'existence d'une série de ferments protéolytiques agissant tous avec une concentration optimum en ions H de 6,0 à 7,0. C'est d'abord une *protéase* qui hydrolyse les albumines naturelles, puis une *trypsine-éprepsine* qui attaque

les albumines coagulées et les peptones, enfin une *amidase* qui disloque les acides aminés.

5. A dose élevée, le sérum normal possède un pouvoir empêchant sur les ferments digestifs des deux microbes. Seule la gélatinase de l'Histolytique n'est pas empêchée.

6. La spécificité étroite des sérums anti-Sporogène et anti-Histolytique dénote que ces deux microbes appartiennent à des espèces différentes.

XII

BIBLIOGRAPHIE

I. — CHOC ET GANGRÈNE GAZEUSE

- CHALIER A. et CHALIER J. — La gangrène gazeuse, *Paris*, 1918.
- DELBET P. — Remarques sur le choc. *Soc. Biol.*, 81, 1918, 858.
- La toxicité des muscles broyés au point de vue de la pathogénie du choc. *C. R. Sciences*, t. CLXIX, 1919, 106.
- DELBET et FIESSINGER N. — Biologie de la plaie de guerre, *Paris*, 1918.
- DUVAL P. et GRIGAUT A. — L'intoxication par les plaies de guerre. La rétention azotée des blessés. *Soc. Biol.*, 81, 1918, 873.
- GAUTRELET J. et LE MOIGNIC. — Etude expérimentale du choc. *Soc. Biol.*, 81, 1918, 868.
- GOVAERTS P. et ZUNZ E. — Les états de collapsus circulatoire. *Soc. Biol.*, 81, 1918, 881.
- LARDENNOIS G. et BAUMEL J. — Les infections gangréneuses des membres consécutives aux plaies de guerre. *Paris*, 1920.
- MESTREZAT W. — Recherches sur le métabolisme des organismes en état de choc. *Soc. Biol.*, 81, 1918, 888.
- OULIÉ G. — Contribution à l'étude des états de choc par intoxication en chirurgie de guerre. *Thèse de Paris*, 1919.
- WEINBERG et SÉGUIN P. — Contribution à l'étiologie de la gangrène gazeuse. *C. R. Sciences*, 163, 1916, 449.
- WERTHEIMER L., FABRE R. et CLOGNE R. — Le choc. *Ann. Fac. Méd. Montévidéo*, mars 1919.

II. — MICROBES ANAÉROBES.

- ACHALME P. — Recherches sur quelques bac. anaér. et leur différenciation. *Ann. Inst. Past.*, 16, 1902, 633.

- BERTHELOT A. — Recherches sur la flore intestinale. *C. R. Sciences*, 153, 1911, 306.
- Ptomaïnes et plaies de guerre. *C. R. Sciences*. t. CLXVI, 1918, 187.
- BERTHELOT et BERTRAND D. M. — Recherches sur la flore intestinale. *Soc. Biol.*, 71, 1911, 232.
- BIENSTOCK. — Ueber die Bakt. der Foeces. *Zeitsch. f. Klin. Med.*, 8, 1884.
- Untersuch. ueber die Aetiologie der Eiweisfäulniss. *Archiv. f. Hyg.*, 36, 1899, 335 ; 39, 1901, 390.
- *B. putrificus*. *Arch. f. Hyg.*, 36, 1899, 216.
- Recherches sur la putréfaction. *Ann. Inst. Past.*, 13, 1899, 854.
- Du rôle des bact. de l'intestin. *Ann. Inst. Past.*, 14, 1900, 750.
- *Bac. putrificus*. *Ann. Inst. Past.*, 20, 1906, 407.
- CAULFEILD, A.-H.-W. — *Bac. perfringens*. *The J. of. Inf. Dis*, 27, 1920, 151.
- CHOUKEVITCH, J. — Et. de la flore bact. du gros intestin du cheval. *Ann. Inst. Past.*, 25, 1911, 246 et 344.
- COSTA, S. et TROISIER, J. — Action hémolytique de certaines bact. anaerob. des bless. de guerre. *Soc. Biol.*, 78, 1915, 354.
- DISTASO, A. — Sur les micr. protéol. de la flore intestinale de l'homme et des animaux. *Centralbl. f. Bakt. O.*, 59, 1911, 97.
- DUENCHMANN, H. — Etude expériment. sur le charbon symptomat. *Ann. Inst. Past.*, 8, 1894, 402.
- EISENBERG. — Hémolysines des Anaérobies. *Soc. Biol.*, 62, 1907, 537.
- FERMI, CL. et BASSU, E. — Untersuchung. ueb. die Anaerobiosis. *Centralbl. f. Bakt. O.*, 35, 1904, 563 et 714.
- GUYONNET, G. — Les Hémolysines bactériennes. *Thèse Bordeaux*, 1919.
- JUNGANO, M. et DISTASO, A. — Les anaérobies. *Paris*, 1910.
- KAMEN — Zur Aetiologie der Gasphlegmon. *Centralbl. f. Bakt. O.*, 35, 1904, 554.
- KLEIN, E. — Ueber einen pathog. anaeroben Darmbacillus, *B. enteritidis Sporogenes*. *Centralbl. f. Bakt.*, 18, 1895, 737 ; 23, 1898, 542.
- LEGROUX, R. — Modifications à l'appareil vide-hydrogène pour les cultures anaérobies en milieux liquides. *Ann. Inst. Past.*, 26, 1912, 635.
- LIBORIUS, P. — Beitr. zur Kenntniss des Sauerstoffbeduerfnisses der Bakt. *Zeits. f. Hyg.*, 1, 1886, 115.
- MARINO, F. — Méthode pour isoler les anaérobies. *Ann. Inst. Past.*, 21, 1907, 1005.

- METCHNIKOFF, E. — Etudes sur la flore intestinale. *Ann. Inst. Past.*, 22, 1908, 929.
- ROUX, F. — Sur la culture des microbes anaérobies. *Ann. Inst. Past.*, 4, 1887, 49.
- SALUS, G. — Zur Biologie der Fäulniss. *Arch. f. Hyg.*, 51, 1904, 97.
- SMITH, TH. — Ueber die Bedeut. des Zuckers in Kulturmedien fuer Bakt. *Centralbl. f. Bakt. Ab.*, 18, 1895, 1.
- Ueber Fehlerquellen bei Pruefung der Gas und Sæurebildung bei Bakter. und deren Vermeidung. *Centralbl. f. Bakt. Ab.*, 22, 1897, 45.
- VEILLON et ZUBER. — Recherches sur quelques microbes strict. anaérobies et leur rôle en pathol. *Arch. Med. expér.*, 1884, 502.
- WEINBERG et SEGUIN. — La gangrène gazeuse. *Paris*, 1918.

III. — DIASTASES MICROBIENES ET FERMENTS SOLUBLES EN GÉNÉRAL

- ABBOTT, A.-C. et GILDERSLEEVE, N. — A Study of the proteol enzymes. *Journ. of Med. Res.*, 10, 1903, 42.
- ABDERHALDEN, E., PINCUSOHN et WALTER, A. — Untersuch. ueb. die Fermente verschied. Bakterienarten. *Zeits. f. physiol. Chem.*, 68, 1910, 471.
- ABDERHALDEN, E. et SCHITTENHELM, A. — Die Wirkung der proteol. Ferment. Keimender Samen des Weizens und der Lupinen auf Polypeptiden. *Zeits. f. physiol. Chem.*, 49, 1906, 26.
- ABDERHALDEN, E. et TERUNCHI, Y. — Vergleich. Untersuch. ueber einige proteol. Ferment. pflanzl. Herkunft. *Zeits. f. physiol. Chem.*, 49, 1906, 21.
- ACHALME, P. — Propriétés pathogènes de la trypsine. *Ann. Inst. Past.*, 15, 1901, 737.
- ACHALME, P. et BRESSON, M. — Infl. de la viscosité du milieu sur les act. diastasiques. *C. R. Sciences*, 152, 1911, 1328.
- ALILAIRE, E. — Expér. sur l'autolyse du colibacille. *Ann. Inst. Past.*, 27, 1913, 118.
- AZON, H. et KLIMPIN, P. — Stud. ueber die proteol. Enzyme in einig. pflanzlich. Nahrungsmitteln. *Bioch. Zeits.*, 9, 1908, 163.
- BAINBRIDGE, F.-A. — The act. of cert. bacteria on proteins. *J. of hyg.*, 11, 1911, 341.
- BEAUJAN. — Etude comparée des act. protéol. et hémolyt. de quelques vibrions cholér. *Soc. Biol.*, 74, 1913, 549.

- BERNBACH P. — Ueber Pyocyanaſe. *Centralbl. f. Bakt. O.* 45, 1908, 355.
- BERTHELOT, A. — Etude bioch. de deux microbes anaérobies du contenu intest. *Ann. Inst. Past.*, 23, 1909, 85.
- BERTIAU, P. — Les ferments bactér. qui liquéfient la gélatine et leurs antiferments. *Centralbl. f. Bakt. O.*, 74, 1914, 374.
- BERTRAND, G. et COMPTON, A. — Température optimale des diastases. *Ann. Inst. Past.*, 26, 1912, 161.
- BIELECKI, J. — Sur la variabil. du pouv. protéol. de la bactér. charbonn. *C. R. Sciences*, 150, 1910, 1548.
- BLANC, J. et POZERSKI, E. — Sur les ferments protéol. de quelq. anaéropathog. Et. du *B. sporogenes*. *Soc. Biol.*, 83, 1920, 1315.
- — Et. du *B. histolyticus*. *Soc. Biol.*, 83, 1920, 1343.
- — Sur les ferments protéol. de quelq. anaérob. pathog. Comparaison avec les ferments anim. et végét. Act. empêchante des sérums norm. et spécifiques. *Soc. Biol.*, 83, 1920, 1369.
- BOUNOURE, L. — Et. comparée de 4 diast. digest. chez quelq. espèces de coléoptères. *C. R. Sciences*, 152, 1911, 230.
- Aliments, chitine et tube digestif chez les Coléoptères. *Thèse Sciences, Paris*, 1919.
- BRASCH, W. — Ueb. der Bakteriell. Abbau primaeren Eiweisspaltprodukt. *Bioch. Zeits.*, 18, 1909, 180.
- BUCHNER, E. et HOFFMANN, R. — Einige Versuche mit Hefepressaft. *Bioch. Zeits.*, 4, 1907, 215.
- CÉSARI, E. et ALLEAUX, V. — Le b. de Schmorl. *Ann. Inst. Past.*, 26, 1912, 625.
- CLARK, W.-M. — The react. of bacteriologic. cult. media. *J. of Inf. Dis.*, 17, 1915, 108, 136.
- CLARK, W.-M. et LUBS H.-A. — The colorimetric determin. of hydrogen concentr. and its applicat. in bacteriol. *J. of Bact.*, Jan 1917, 1, 34; March 1917, 109, 136; May 1917, 191, 236.
- COMPTON, A. — The influence of the Hydrogene Concentr. up. the optim. temperature of a ferment. *Proceed. Roy. Soc. B.*, 88, 1915, 408.
- DELEANU, N.-T. — L'hydrol. des subst. albumin. d'origine végét. sous l'infl. de la papaïne. *Bull. sect. scient. Acad. roumaine*. Déc., 1915, 207.
- DELEZENNE, C. — L'action du suc intestinal dans la digestion tryptique des mat. albumin. *Soc. Biol.*, 53, 1901, 1161.
- Les kinases microbiennes. Leur act. sur le pouv. digestif du suc pancréat. *C. R. Sciences*, 135, 1902, 252.

- Sur l'existence d'une kinase dans le venin des serpents. *C. R. Sciences*, 135, 1902, 328.
- Activat. du suc pancréat. par les sels de calcium. *Soc. Biol.*, 59, 1905, 476 et 523.
- Format. d'un ferment-lab dans le suc pancréat. soumis à l'act. des sels de calcium. *Soc. Biol.*, 63, 1907, 98.
- Spécificité des sels de calcium dans la format. de la trypsine. *Soc. Biol.*, 63, 1907, 274.
- DELEZENNE, C. et MOUTON, H. — Coagul. des solut. concentrées de peptones par le suc pancréat. soumis à l'action des sels de calcium. *Soc. Biol.*, 63, 1907, 277.
- DERNBY, K.-G. — Studien ueb. die proteol. Enzyme der Hefe. *Bioch. Zeits*, 81, 1917, 107.
- A study on autolysis of animal tissues. *The J. Biol. Chem.*, 35, 1918, 2.
- DIEHL, H.-S. — The specificity of bact. proteol. enzymes and their format., *J. of Inf. Dis*, 24, 1919, 347, 361.
- DUCLAUX, E. — Le lait, 1887.
- Tr. de Microbiol., 1898.
- DUCLAUX, J. — Les colloïdes. *Paris*, 1920.
- V. DUNGERN. — Eine neue Serumreakt. *Münch. med. Wschr.*, 1898, 1040, 1457.
- EFFRONT, J. — Sur les ferments putrides. *Monit. scient. Quesneville*. V^e, t. I, 1911, 489.
- Les catalyseurs biochimiques. *Paris*, 1914.
- EMMERLING, O. — Die Zersetzung stickstofffreien organ. substanz. durch Bakt. *Braunschweig*, 1902.
- EULER, H. — Ueber Enzymbildung. *Bioch. Zeits.*, 85, 1918, 406.
- Zur Nomenclatur der Enzyme. *Zeits. physiol. Chem.*, 74, 1911, 13.
- EULER, H. et JOHANSSON, D. — Untersuch. ueb. die chem. Zusammensetzung u. Bild. der Enzyme. *Zeits. physiol. Chem.*, 78, 1912, 246.
- FALK, I.-S. — The influence of certain salts on enzyme act. *J. Biol. Chem.*, 36, 1918, 239.
- FERMI. — Ueb. Spezifizität u. andere Eigenschaften der Ektoproteasen. *Centralbl. f. Bakt. O.*, 68, 1913, 433 ; 69, 1913, 465 ; 73, 1914, 401.
- FERNBACH et SCHÖEN. — Quelques observ. sur le mécan. de fonct. des diast. protéol. *C. R. Sciences*, 153, 1911, 133.
- FUHRMANN, F. — Vorlesungen ueb. Bakterienenzyme. *Iena*, 1907.
- FUNK et NEUMANN. — La caséification du lait cru par les présures du lait bouilli. *C. R. Sciences*, 150, 1910, 1202.

- GERBER. — Identité entre la présure, la caséase et la trypsine d'un même latex. Existence de deux types de ferments protéol. végét. *C. R. Sciences*, 157, 1913, 241.
- GRIGAUT, A., GUÉRIN, F. et MAD. POMMAY-MICHAUX. — Sur la mesure de la protéolyse microb. *Soc. Biol.*, 82, 1919, 66.
- GRIGAUT, A. et GUÉRIN, F. — Dosage colorimétrique de l'azote non protéique du sang par le réactif de Nessler. *Soc. Biol.*, 81, 1918, 1139.
- GRIMBERG. — Ferment. anaér. produite par le *B. orthobutylicus*. *Ann. Inst. Past.*, 7, 1893, 353.
- V. GROER. — Ueb. die Prodigiosus-Gelatinase. *Bioch. Zeits.*, 38, 1912.
- HATA, S. — Ueb. einige Bakterienenzyme u. deren Antikörper. *Centralbl. f. Bakt. Ref.*, 34, 1903, 208.
- HERBERT, H. — An Investigat. of the cultural react. of certain anaerobes found in wounds. *J. of Path. and Bact.*, 21, 1916, 1917, 344.
- HERZFELD, E. — Beiträge zur Chem. der proteol. Fermente. *Bioch. Zeits.*, 64, 103; 68, 1914, 402; 70, 1915, 262.
- HERZOG, O. — Zur Frage der Beziehung zwischen Pepsin u. Labwirkung. *Zeits. physiol. Chem.*, 60, 1909, 307.
- HERZOG, O. et MARGOLIS, M. — Ueb. die Einwirkung von pepsin auf ovalbumin. *Zeits. physiol. Chem.*, 60, 1909, 298.
- HOLDERER M. — Filtration des enzymes. *Thèse de Paris*, 1911.
- JACOBY M. — Ueber Fermentbildung. *Bioch. Zeits.*, 79, 1917, 35; 80, 1917, 357; 81, 1917, 332; 83, 1917, 74; 84, 1917, 358; 86, 1918, 329.
- Ueb. Harnspaltung durch Bakt. *Bioch. Zeits.*, 74, 1916, 109.
- JESSEN-HANSEN: — Die Formoltitration. *Abderhaldens Handb. bioch., Arbeit.*, 6, 270.
- JONES, H.-M. — The protein-sparing act. of utilizable carbohydrates in cult. of certain sugar-fermenting organism. *J. of Inf. Dis.*, 19, 1916, 33.
- JORDAN, E.-O. — Experiment with bacterial enzymes. *Biol. Stud. by the pupils of W. T. Sedgwick*, 1906, 124.
- KENDALL, A.-I. et FARMER, CH.-J. — Stud. in bact. metabol. *J. Biol., Chem.*, 12, 1912.
- KENDALL, A.-I. et WALKER, A.-W. — Observ. on the proteolyt. enzym. of *B. proteus*. *J. of Inf. Dis.*, 17, 1915, 442.
- KÖLKER, A.-H. — The Stud. of enzymes by means of the synthetic polypeptides. *The J. Biol. Chem.*, 8, 1910, 145.
- KLIGLER, I.-J. — The effect of hydrog. ion concentr. on the product. of precipit. in a solut. of peptone and its relat. to the nutritiv. value of media. *J. of Bact.*, 1917, 351.

- KORENTCHEWSKY. — Contribut. à l'étude biol. du *B. perfringens* et du *B. putrificus*. *Ann. Inst. Past.*, 23, 1909, 91.
- LAUNOY, L. — Pouvoir antitryptique du sérum sanguin. *Soc. Biol.*, 81, 1918, 416.
- Principes d'une technique p. suivre la marche de la protéol. dans un milieu gélatine-trypsine. *Soc. Biol.*, 81, 1918, 742.
 - De l'act. antagoniste d'un sérum sang. contre les protéases microbiennes. *Soc. Biol.*, 82, 1919, 57.
 - Sur l'antiprotéase du *B. pyocyaneus*. *Soc. Biol.*, 82, 1919, 263.
 - Sérum anti-protéases microbiennes. *Ann. Inst. Past.*, 33, 1919, 1 et 657; 34, 1920, 249.
- LAUNOY et MAD. DEBAT-PONSAN. — Sur la protéase du vibron cholérique. *Soc. Biol.*, 82, 1919, 578.
- LAUNOY et LÉVY-BRUHL. — Act. du sérum des animaux infectés par le *B. pyocyaneus* sur la protéase de cette bactérie. *Soc. Biol.*, 82, 1919, 1274.
- LAWROW, D. — Ueb. die Wirkung des Pepsins resp. Labferments auf konzentr. Lösungen der produkte der peptischen Verdauung der Eiweisskörper. *Zeits., physiol. Chem.*, 51, 1907, 1.
- LAZARUS, EL. (Mlle). — Sur l'inconstance du pouv. protéol. de la b. de DAVAINÉ. *Soc. Biol.*, 66, 1909, 823.
- Influence de la réaction des mil. de cult. sur le développ. et l'activité protéolyt. de la b. de DAVAINÉ. *C. R. Sciences*, 149, 1909, 423.
 - Sur la protéolyse de la bact. charb. *Ann. Inst. Past.*, 24, 1910, 577.
- LINossier, G. — Sur l'antipepsine du sérum normal. *Soc. Biol.*, 82, 1918, 422.
- MALFITANO et LAZARUS, E. (Mlle). — Pouv. protéol. de la bactériidie charbonneuse. *Soc. Biol.*, 63, 1907, 761.
- MALFITANO, G. et STRADA, F. — Des influences qui peuvent faire varier le pouv. protéol. des liqu. en contact avec la bactériid. du charbon. *Soc. Biol.*, 59, 1905, 120.
- Des variations de l'activité protéol. des bactériidies avec l'âge des cultures. *Soc. Biol.*, 59, 1905, 195.
- MC. CRUDDEN, F.-H. — The products resulting from the putrefact. of fibrin by *clostridium carnositidis* SALUS and RAUSCHERAND. *J. Biol. Chem.*, 8, 1910, 109.
- MEDALIA, L.-S. — Color standards for the colorimetric measurement of H ion concentr. pH 1,2 to pH 9,8. *J. of Bact.*, 5, 1920, 441.
- MENDEL, B., LAFAYETTE and BLOOD, AL -F. — Some peculiarities of the protéol. activity of papain. *The J. Biol. Chem.*, 8, 1910, 177.

- MESERNITZKI P. — Ueb. die Zersetzung der Gelatin durch *M. prodigiosus*. *Bioch. Zeits.*, 29, 1910, 104.
- MEYER, K. — Zur Kenntniss der Bakterienproteasen *Bioch. Zeits.*, 32, 1911, 274.
- Ueb. Antibakterienproteasen. *Bioch. Zeits.*, 32, 1911, 280.
- MICHELIS, L. et MENDELSSOHN. — Die Wirkungsbedingungen des Pepsins. *Bioch. Zeits.*, 65, 1914, 1.
- MOHR, L. et BEUTTENMUELLER, H. — Die Methodik der Stoffwechseluntersuch. *Wiesbaden*, 1911.
- MORESCHI, C. — Diastasi e antidiastasi proteolitica del *V. cholerae*. *Giorn. d. R. Soc. Ital. d'Ig.*, 1903, 4.
- NICOLLE M. — Action du *B. subtilis* sur diverses bactéries. *Ann. Inst. Past.*, 21, 1907, 613.
- L'autolyse. *Ann. Inst. Past.*, 27, 1913, 97.
- NICOLLE, M. et POZERSKI, E. — Sur le sort des composants du suc pancréat. au cours de son activation. *Ann. Inst. Past.*, 25, 1911, 336.
- OKADO S. — On the opt. react. for pepsin. *Bioch. Journ.*, 10, 1916, 126.
- OPPENHEIMER, C. — Die Fermente, 1913, *Leipzig*.
- PALITZSCH, S. et WALBUM, L.-E. — Sur la concentr. optim. des ions H p. la prem. phase de la décomposition tryptique de la gélatine. *C. R. des Trav. du Lab. de Carlsberg*, 9, 1912, 200.
- PERDRIX. — Sur la transformation des matières azotées dans les cult. de la bactériidie charbonn. *Ann. Inst. Past.*, 2, 1888, 354.
- POZERSKI, E. — Contribution à l'étude physiolog. de la papaïne. *Thèse Paris*, 1908.
- ROHONYI, H. — Enzymwirkung u. elektrolitische Dissoziation. *Bioch. Zeits.*, 32, 1911, 176.
- ROBERTSON, T.-B. — Die physikalische Chemie der Proteine. *Dresden*, 1912.
- RONA, P. et ARNHEIM, F. — Beitrag zur Kenntniss des Erepsins. *Bioch. Zeits.*, 57, 1913, 84.
- RUBINSTEIN, M. — Rech. sur le pouv. antipeptique du sérum. *Ann. Inst. Past.*, 27, 1913, 1074.
- L'act. des substances protéiques du sérum est comparable à celle du blanc d'œuf sur le pouv. antipeptique. *Ann. Inst. Past.*, 27, 1913, 1086.
- SASAKI, T. — Ueb. den Abbau einiger Polypeptide durch Bakt. *Bioch. Zeits.*, 41, 1912, 174.
- SAWITSCH. — Zur Frage nach der Identität der Milchkoagulierenden u. proteolytisch. Fermente. *Zeits., physiol. Chem.*, 55, 1908, 84.

- SCHMIDT, E.-W. — Enzymolog. Mitteilungen. *Zeits. physiol. Chem.*, 67, 1910, 314.
- SELLIER, J. — Recherches s. les ferments protéol. des Invertébrés, *Thèse Paris*, 1911.
- SLYKE (VAN), D.-D. — A method for quantitative determination of aliphatic amino groups. *J. Biol. Chem.*, 9, 1914, 485 ; 12, 1912, 402 ; 16, 1913, 124.
- SCERENSEN, S.-P.-L. — Sur la mesure quantitative des scissions protéolyt. Titration au formol. *C. R. Lab. Carlsberg*, 7, 1907, 1.
- Sur la mesure et l'importance de la concentration des ions H dans les réactions enzymatiques. *C. R. Lab. Carlsberg*, 8, 1910, 1 à 170 et 396.
- SPIEGELBERG. — Sur les protéolytiques dans les infect. gastro-intestin. *Jahrb. f. Kind.*, 49, 1899, 194.
- STASSANO, H. et TALARICO, J. — De l'influence de la cuisson sur la digestibilité du lait. De l'influence de la cuisson sur la caséification du lait par le lab-ferment. *Soc. Biol.*, 69, 1910, 251.
- TALARICO, J. — De l'influence de la cuisson sur la digestibilité de la viande. *Soc. Biol.*, 68, 1910, 932.
- TISSIER, H. — Recherches sur la flore intestinale normale et path. du nourrisson. *Thèse, Paris*, 1900.
- Act. comparée des microbes de la putréfaction sur les princip. albumines. *Ann. Inst. Past.*, 26, 1912, 522.
- Application des données bactériologiques à la Chirurgie de guerre. *Bull. Inst. Past.*, 15, 1918, 276.
- TISSIER, H. et MARTELLY. — Putréfaction de la viande de boucherie. *Ann. Inst. Past.*, 16, 1902, 865.
- TSCHERMACK. — Ueb. adaptive Fermentbildung in Verdauungskanal. *Bioch. Zeits.*, 45, 1912, 452.
- VAUCHER, E. et GUÉRIN, F. — Act. du *B. sporogènes* sur quelques hydrates de carbone et sur les matières protéiques des milieux de culture. *Soc. Biol.*, 81, 1918, 362.
- VINES. — *Ann. of Bot.*, 18, 1904, 289 ; 23, 1909, 1.
- DE WAELE, H. — Protéolase et antiprotéolase dans les cultures microbiennes. *Centralbl. f. Bakt. I. Orig.*, 50, 1909, 40.
- DE WAELE, H. et VAN DE VELDE, A.-J.-J. — Sur les ferments protéolytiques des microbes. Méth. d'évaluat. quantitative de la liquéfact. de la gélatine. *Centralbl. f. Bakt. O.*, 39, 1905, 353.
- WOLF, C.-G.-L. et VEITCH-TELFER, ST. — Contribut. to the Bioch. of pathog. anaerob. *The Bioch. J.*, 11, 1917.

WOLF, C.-G.-L. et HARRIS, J.-E.-G. — Contribut. to the Bioch. of pathog. anaerob. *The Bioch. J.*, 11, 1917.

— — Contribut. to the Bioch. of path. anaerobes. *The J. of path. and bact.*, 21, 1917, 386.

WOLLMANN. — *B. coli* comme indicateur de la protéolyse. *Soc. Biol.*, 82, 1919, 1263.

ZALESKI, W. et SCHATALOFF, W. — Beitræge zur Kenntniss der Eiweissumwandl. in der Hefe. *Bioch. Zeits.*, 69, 1915, 294.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Physiologie. — Suc pancréatique et kinase.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 11 avril 1921.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,
M. MOLLIARD.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,
P. APPELL.

